

Gène HLA-G : le plus classique des non classiques

Philippe Le Bouteiller
Françoise Lenfant

Le gène *HLA-G*, gène du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I a longtemps été considéré comme « non classique », du fait de son faible polymorphisme, de la restriction tissulaire de son expression (trophoblaste au cours de la grossesse), de son absence de rôle défini. Mais sa structure générale est très voisine de celle des gènes *HLA* de classe I et on en a trouvé récemment d'assez nombreux allèles ; son expression n'est plus restreinte au seul trophoblaste et, surtout, on a montré qu'il exerçait deux fonctions classiques pour des molécules du CMH : son produit présente de façon restreinte les peptides de molécules étrangères au récepteur de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques et se lie aux récepteurs des cellules NK (*natural killer*), exerçant sur ces cellules un effet, soit stimulateur, soit inhibiteur.

Les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I humains (comme ceux de la plupart des vertébrés) ont été subdivisés en deux catégories en fonction de leurs propriétés structurales et fonctionnelles : les gènes du CMH de classe I classiques ou de classe Ia (*HLA-A*, *-B*, *-C*) et les gènes du CMH de classe I non classiques ou de classe Ib (*HLA-E*, *-F*, *-G*). Ces deux types de gènes sont localisés sur la même région chromosomique (bras court du chromosome 6, région 6p21.3), les locus *B* et *C* en position centromérique, les locus *A*, *F*, *G* en position télomérique et le locus *E* situé entre les deux [1].

Gènes HLA de classe I classiques et non classiques : principales caractéristiques

Les gènes *HLA* de classe Ia codent pour des chaînes lourdes glycopro-

téiques (45kDa) qui s'associent de façon non covalente à une chaîne légère non polymorphe appelée β 2-microglobuline (β 2m). Ils sont définis par les caractéristiques suivantes.

Ils sont extrêmement polymorphes

Plus de 186 allèles ont été décrits à ce jour pour le locus *HLA-B*, 83 pour *HLA-A*, 42 pour *HLA-C*, la plupart des individus étant hétérozygotes [2]. Les substitutions des acides aminés à l'origine de ce polymorphisme et qui permettent de distinguer les différents allèles sont localisées principalement à l'intérieur ou à proximité du site de fixation des peptides formé par les domaines externes α 1 et α 2. Un tel degré de polymorphisme a des conséquences fonctionnelles bien connues puisqu'il est à l'origine du déclenchement d'une réponse cytotoxique particulièrement forte envers des tissus allogéniques greffés et reste donc la cause, en l'absence d'une immunosuppres-

ADRESSE

P. Le Bouteiller : directeur de recherche à l'Inserm. F. Lenfant : chargée de recherche à l'Inserm. Inserm U. 395, CHU Purpan, BP 3028, 31024 Toulouse Cedex, France.

sion induite, des réactions de rejet de greffes entre individus non HLA-identiques.

Leur distribution tissulaire est très largement répartie sur l'ensemble des tissus somatiques [3]

Leur synthèse, dont le niveau varie selon le tissu, ne peut toutefois pas être considérée comme ubiquitaire car certains types cellulaires sont dépourvus de molécules de classe Ia à leur surface : c'est notamment le cas des neurones ou de certaines sous-populations de cellules trophoblastiques [3].

Leurs fonctions dans la défense immunitaire contre différents pathogènes et molécules du soi modifiées (produites par les cellules cancéreuses par exemple) sont bien établies

Les molécules du CMH de classe Ia ont la capacité de présenter des peptides (le plus souvent nonamériques) dérivés de protéines intracellulaires aux récepteurs T (TCR) des lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Les conséquences de cette reconnaissance spécifique par le TCR d'un peptide présenté par une molécule de classe Ia sont la lyse des cellules cibles (infectées par un virus ou modifiées par la tumorigénèse) ainsi que la sécrétion de diverses cytokines ayant la capacité de limiter la dissémination des agents pathogènes. Ce concept de restriction de la lyse par les molécules du CMH de classe Ia, mis en évidence pour la première fois par Zinkernagel et Doherty, a valu un récent prix Nobel à leurs auteurs [4].

Une cellule sans molécule du CMH de classe I à sa surface, comme c'est parfois le cas pour certaines cellules cancéreuses ou cellules infectées par un virus, n'échappe pas pour autant à la « surveillance » du système immunitaire. Elles peuvent être alors reconnues et lysées par les cellules NK (*natural killer*). Ce sont des lymphocytes cytotoxiques capables de lyser des cellules cibles [5]. Les cellules NK reconnaissent, grâce à un certain nombre de récepteurs appelés récepteurs NK, les molécules du CMH de classe Ia comme des ligands qui induisent dans ces cellules des signaux de transmission négatifs et/ou positifs entraînant (selon le

type de récepteurs) une inhibition ou, au contraire, une stimulation de la lyse [6]. Les molécules du CMH de classe Ia ont donc la capacité d'interagir avec deux types de cellules lymphoïdes utilisant la stratégie de la cytotoxicité : les CTL et les cellules NK, dérivées d'un progéniteur commun.

Ils sont conservés au cours de l'évolution

On retrouve en effet les homologues des gènes *HLA* de classe I classiques dans toutes les classes de vertébrés (de un à trois locus fonctionnels selon les espèces).

Par opposition, les gènes *HLA* de classe Ib sont définis par un polymorphisme très limité, une distribution tissulaire restreinte et une absence de fonction définie. Un ensemble de données récentes laisse à penser que de tels critères de définition ne s'appliquent plus tout à fait aujourd'hui au gène *HLA-G*. Ce gène, appelé tout d'abord *HLA-6.0* de par la taille du fragment *Hind* III le contenant, a été cloné pour la première fois en 1987 par Geraghty *et al.* (Seattle, WA, USA) [7]. Longtemps considéré comme un gène « en voie d'extinction » et donc sans aucune signification fonctionnelle, *HLA-G* a soudain exercé un attrait croissant pour nombre de laboratoires lorsqu'il est apparu de plus en plus clairement que ce gène du CMH de classe Ib possède une partie des propriétés attribuées aux gènes *HLA* de classe Ia et qu'il pourrait donc exercer des fonctions immunologiques, en particulier au cours de la gestation. En effet, sa distribution tissulaire longtemps considérée comme uniquement restreinte à certaines cellules du trophoblaste ne produisant pas de molécules HLA-A et -B et constituant l'interface fœto-maternelle [8], a été à l'origine de multiples hypothèses émises sur son importance fonctionnelle potentielle au cours de la grossesse : *HLA-G* participerait au maintien d'un état de tolérance entre la mère et son enfant lors de la gestation en anergisant la réponse immunitaire maternelle anti-paternelle à l'interface fœto-maternelle (le fœtus exprimant des antigènes d'origine paternelle peut, en effet, être considéré comme une

greffe semi-allogénique tolérée par la mère) [3, 8, 9].

Après avoir rappelé les principales analogies et particularités structurales du gène *HLA-G* par rapport aux gènes *HLA* de classe I classiques, nous nous proposons de reprendre les différents critères mentionnés ci-dessus qui caractérisent les gènes du CMH de classe Ia et nous verrons que le gène *HLA-G* n'est pas loin de pouvoir postuler une entrée au « club » des gènes *HLA* de classe I classiques.

Gènes *HLA-G* et *HLA* de classe I classiques : similitudes et particularités structurales

Mentionnons tout d'abord les principales analogies structurales existant entre gène *HLA-G* et gènes *HLA* de classe I classiques ainsi qu'entre leurs produits d'expression (*figure 1*). L'organisation introns/exons typique des gènes du CMH de classe Ia est identique [7] : huit exons codant respectivement pour une séquence signal (exon 1), trois domaines externes (exons 2, 3, 4), un domaine transmembranaire (exon 5), un domaine cytoplasmique (exons 6 et 7) et une région 3' non traduite (exon 8). La chaîne lourde *HLA-G* s'exprime en association avec la $\beta 2m$. La plupart des autres caractéristiques structurales des molécules *HLA* de classe I classiques sont retrouvées dans *HLA-G* : conservation des résidus cystéines en positions 101-164 et 203-259, permettant la formation de ponts disulfures à l'intérieur des domaines $\alpha 2$ et $\alpha 3$; conservation d'un site de glycosylation (Asp 86) dans le domaine $\alpha 1$, taille identique du domaine transmembranaire hydrophobe (27 acides aminés). La protéine *HLA-G* (isoforme complète) présente 86 % d'identité avec la séquence protéique consensus *HLA-A, B, C*, le domaine $\alpha 3$ présentant le degré d'identité le plus fort (91 %) et les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ identiques, respectivement, à 81 % et 85 % [7]. Le domaine $\alpha 3$ de *HLA-G*, en particulier, contient les résidus nécessaires à une liaison non covalente avec la $\beta 2m$ et ceux qui permettent la fixation de la forme homodimérique du co-récepteur CD8.

Résumons ensuite les particularités structurales du gène *HLA-G* par rap-

Le gène *HLA-G* n'est pas oligomorphe

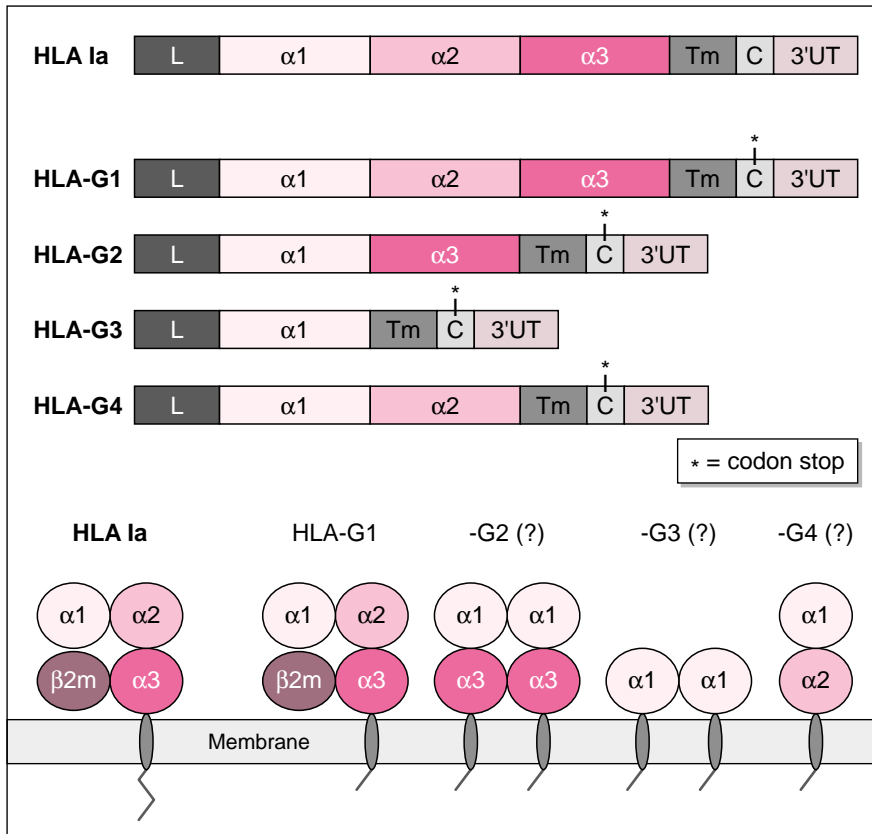


Figure 1. **Comparaison structurale des isoformes membranaires de HLA-G avec les molécules HLA de classe Ia** (adapté d'après [9, 11]). Haut : isoformes transcriptionnelles HLA-G1, -G2, -G3, -G4 par comparaison avec les transcrits HLA de classe I a (HLA Ia). L : séquence leader ; $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$: domaines externes $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$; TM : domaine transmembranaire ; C : domaine cytoplasmique ; 3'UT : région 3' non traduite. Les isoformes HLA-G2, -G3 et -G4 sont plus courtes car elles ont perdu un ou deux domaines externes par épissage alternatif. La présence d'un codon stop dans le domaine cytoplasmique empêche la traduction de l'ensemble du domaine : la queue cytoplasmique de HLA-G est donc plus courte. Bas : représentation schématique des isoformes protéiques potentielles de HLA-G comparées à une molécule HLA de classe Ia (HLA Ia). $\beta 2m$: $\beta 2$ -microglobuline. La queue cytoplasmique des molécules HLA-G est plus courte que celle des molécules HLA de classe I classique. L'isoforme HLA-G2 pourrait former un dimère [9]. Les produits de traduction HLA-G2, -G3 et -G4 n'ont pas encore été mis en évidence.

port aux gènes HLA de classe I classiques : (1) présence d'un codon stop dans le domaine cytoplasmique [7] entraînant la traduction d'une queue cytoplasmique courte (six acides aminés) dépourvue de résidu tyrosine (figure 1), avec toutes les conséquences potentielles concernant d'éventuels signaux de transmission ; la masse moléculaire de la protéine HLA-G est donc de 39-40 kDa ; (2) existence d'épissages alternatifs d'un ou de deux exons codant pour des domaines externes [9-11], à l'origine de cinq isoformes transcriptionnelles

(potentiellement membranaires ou solubles) plus courtes que l'isoforme complète (figures 1 et 2) : la forme soluble protéique HLA-G1 contient 21 acides aminés supplémentaires à la suite du domaine $\alpha 3$ (figure 2) qui sont codés par les nucléotides de l'intron 4 [9] ; (3) absence dans le promoteur des séquences nucléotidiques régulatrices de types *KB* et *interferon consensus sequence* présentes sur les gènes HLA de classe Ia (figure 3), ce qui suggère une régulation particulière de la transcription de ce gène [3, 12, 13].

Longtemps considéré comme non polymorphe, plusieurs travaux récents démontrent qu'il n'en est rien. Plusieurs allèles de *HLA-G*, dont certains polymorphes au niveau des acides aminés, ont été décrits par plusieurs groupes [3]. Les résultats les plus surprenants sont ceux de l'équipe de Carole Ober (Chicago, IL, USA) [14] qui a décrit, à partir d'une population américaine d'origine africaine, vingt-six allèles de *HLA-G* dus à des substitutions non synonymes, principalement dans l'exon 3 codant pour le domaine $\alpha 2$. Par séquençage de fragments de gènes *HLA-G* séparés par analyse en SSCP (*single stranded conformational polymorphism*) et amplifiés par PCR, de multiples variations de séquences ont été observées sur les codons 92, 101, 107, 120 et 178. Parmi les substitutions en acides aminés détectées, les suivantes pourraient avoir des conséquences fonctionnelles importantes : la substitution en position 167 car elle est localisée sur un résidu fonctionnel de la poche à peptides ; les substitutions des résidus cystéines 101 et 164 (seules les formes hétérozygotes ont été observées) car elles entraînent une rupture des ponts disulfure et donc probablement une modification de la conformation de la molécule ; le remplacement du résidu 107 (forme hétérozygote) par un codon stop qui empêche ainsi la traduction d'une protéine complète ; la substitution du résidu 110 (leucine en isoleucine), car elle a été retrouvée dans cette étude chez 39% des individus testés et chez 45% des individus d'origine japonaise testés au cours d'une autre étude dans un laboratoire différent [15]. Les auteurs de ces observations ont estimé qu'approximativement 67% des individus testés étaient hétérozygotes pour HLA-G au niveau protéique [14]. Les sites polymorphes sont essentiellement situés dans la région de la poche à peptides, la variabilité nucléotidique de *HLA-G* se retrouvant principalement sur le domaine $\alpha 2$. Une étude plus récente du polymorphisme de HLA-G a été effectuée par le même laboratoire sur une population caucasienne homogène, les Huttérites, dont les

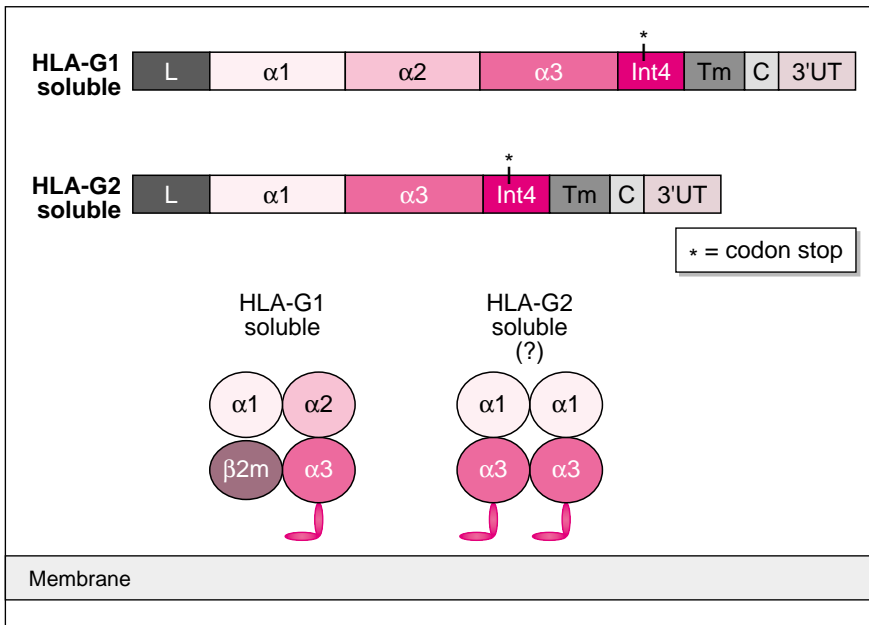


Figure 2. **Isoformes solubles de HLA-G (adapté d'après [9]).** Haut : isoformes transcriptionnelles HLA-G1s, -G2s. L : séquence leader ; $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$: domaines externes $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$; TM : domaine transmembranaire ; C : domaine cytoplasmique ; 3'UT : région 3' non traduite. L'isoforme HLA-G2s est plus courte que l'isoforme HLA-G1s car elle a perdu le domaine externe $\alpha 2$ par épissage alternatif. La transcription de l'intron 4 (Int 4) et la présence d'un codon stop dans cet intron entraîne la traduction d'une partie de cet intron mais empêche la traduction des domaines transmembranaires et cytoplasmiques. Bas : représentation schématique des isoformes solubles protéiques potentielles de HLA-G. $\beta 2m$: $\beta 2$ -microglobuline. Les produits de traduction HLA-G2s n'ont pas encore été mis en évidence. Ils pourraient potentiellement former un dimère.

individus sont descendants de seulement 64 ancêtres [16]. Six allèles de HLA-G ont été détectés dans cette population dont trois différents au niveau des acides aminés, les résidus polymorphes étant localisés aux codons 31 (domaine $\alpha 1$) et 110 (domaine $\alpha 2$). Cinq des six allèles ont été observés dans d'autres populations [16]. Le faible polymorphisme de HLA-G chez les Huttérites est toutefois à rapprocher du répertoire limité des allèles HLA-A, -B, -C, -DR et -DQ dans cette population [16]. Une observation intéressante est le très fort déséquilibre de liaison* existant entre HLA-G et les allèles de HLA-A dans cette popula-

* Certains allèles du CMH sont retrouvés dans des haplotypes à des fréquences supérieures ou inférieures à celles attendues si tous les allèles du CMH avaient atteint un équilibre génétique. Ce phénomène appelé « déséquilibre de liaison » peut être le reflet de l'origine récente de certains allèles, de la sélection ou de la suppression de certains haplotypes par rapport à d'autres.

tion [16], confirmant des études antérieures [17, 18]. Chacun des six allèles de HLA-G n'est associé qu'à un nombre relativement limité d'haplotypes HLA-A. Par exemple, huit des dix haplotypes HLA-A2 présents dans cette population sont associés à l'un des allèles HLA-G. Seuls trois (A2, A24 et A32) des douze allèles HLA-A présents dans cette population sont associés à plus d'un allèle HLA-G. HLA-A24 est le seul allèle HLA-A à être associé à trois allèles différents de HLA-G [16]. Bien qu'il faille donc encore rester prudent tant que le polymorphisme important de HLA-G mentionné ci-dessus pour une population particulière n'aura pas été retrouvé dans d'autres ethnies, on peut pour l'instant conclure que HLA-G présente néanmoins un polymorphisme, certes limité, mais dont l'ampleur ressemblerait plus à celui du locus HLA-C. L'hétérozygotie importante de HLA-G mentionnée dans l'étude

de C. Ober soulève la question d'une induction de réponses cytotoxiques allogéniques lors de la gestation ou à la suite de transplantations. Une hypothèse avancée par l'équipe de Geraghty [9] est que la forme soluble de HLA-G pourrait anergiser les cellules T alloréactives en fixant les allo-peptides d'origine paternelle. Une autre question soulevée par la description de ce polymorphisme de HLA-G est la suivante : l'homozygotie de certains allèles pourrait-elle avoir des conséquences désastreuses en termes de gestation et/ou de perte de résistance à certains pathogènes ?

La distribution tissulaire de HLA-G n'est pas uniquement restreinte aux cellules cytotrophoblastiques extravillieuses

Les premières démonstrations d'une expression placentaire du gène HLA-G sont apparues en 1990 [19, 20]. Depuis cette époque, plusieurs laboratoires ont largement confirmé que cette expression (transcriptionnelle et protéique) concernait principalement les cellules du cytotrophoblaste extravillieux : trophoblaste extravillieux de la plaque basale, trophoblaste endovasculaire à l'intérieur des artères spiralées maternelles, trophoblaste invasif interstitiel, cellules trophoblastiques géantes [8]. Ces cellules du cytotrophoblaste extravillieux envahissent très tôt au cours de la gestation les tissus maternels (décidua, artères spiralées) et sont donc au contact des agents cellulaires du système immunitaire maternel, principalement cellules T et cellules NK [8], ces dernières étant particulièrement abondantes aux sites d'implantation dans plusieurs espèces de mammifères [21]. Un gradient décroissant de l'expression de HLA-G dans ces cellules au cours de la gestation a de plus été observé (forte expression en début de grossesse, faible expression à terme). La notion que l'expression tissulaire de HLA-G était restreinte à ce seul type cellulaire présent dans le placenta s'est peu à peu imposée. Au vu d'un certain nombre de résultats récents et avec l'avènement de réactifs monoclonaux spécifiques des produits du

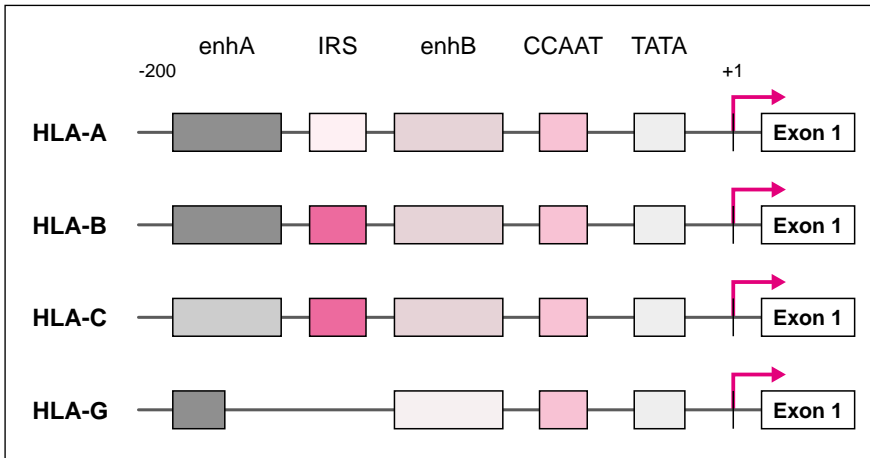


Figure 3. **Éléments régulateurs présents dans la région promotrice des gènes HLA de classe I : comparaison entre les locus HLA-A, -B, -C de classe I classiques et HLA-G.** Les chiffres indiquent les positions approximatives des séquences par rapport au site de début de la transcription. enh A : région régulateur enhancer A comportant le site κB sur lequel se fixent les facteurs de transcription de la famille κB ; IRS : interféron responsive sequence ; enh B : région régulateur enhancer B ; CCAAT : boîte CCAAT ; TATA : boîte TATA (TCTAAA pour les gènes HLA de classe I). Les couleurs différentes d'un élément régulateur reflètent des différences de séquences nucléotidiques. La région enhA présente dans le gène HLA-G est délétée de 5 paires de bases. Le détail de ces différentes séquences nucléotidiques est donné dans la référence [3]. Une séquence régulateur de 244 paires de bases délimitée par les sites de coupures des enzymes Hind III et EcoRI et située à 1,1 kilobases du site d'initiation de la transcription du gène HLA-G a été également décrite par plusieurs auteurs [12, 13].

gène *HLA-G* [8, 10, 22, 23], il semble qu'il faille maintenant moduler cette affirmation. L'expression transcriptionnelle de *HLA-G*, y compris des différentes isoformes, est très largement représentée dans l'ensemble des tissus humains adultes et embryonnaires [22, 24]. Les rares cellules qui ne synthétisent pas de transcrits *HLA-G* détectables par la technique ultrasensible de *reverse-transcriptase* PCR sont les cellules CD34⁺ et les cellules NK [25]. Des souris transgéniques *HLA-G* synthétisent des transcrits de ce transgène dans le placenta mais également dans les tissus adultes suivants : testicule, thymus, ovaire, rate, foie, cerveau, peau [12]. En ce qui concerne la synthèse protéique de *HLA-G*, plusieurs résultats semblent indiquer que *HLA-G* pourrait être synthétisée dans d'autres types cellulaires présents dans le placenta que les cellules du cytotrophoblaste extravilleux : cellules du cytotrophoblaste villositaire de début de gestation [23], cellules de l'épithélium amniotique et liquide amniotique [26],

partie trophoblaste du blastocyste aux stades 2-16 cellules [27], phagocytes mononucléaires du sang périphérique ainsi que macrophages activés par l'interféron- γ [28]. Bien qu'un certain nombre de questions restent encore sans réponse (les différentes isoformes transcriptionnelles de *HLA-G* sont-elles toutes traduites en produits membranaires et/ou solubles?) et que la distribution tissulaire de *HLA-G* ne soit pas superposable à celle des molécules *HLA* de classe I classiques, il semble néanmoins de plus en plus évident que *HLA-G* puisse s'exprimer ailleurs que dans les cellules du cytotrophoblaste extravilleux. Il n'est pas non plus exclu que l'expression de *HLA-G* apparaisse ou soit modifiée lors d'infections ou de malignité [24]. Enfin, il est intéressant de noter que l'expression de *HLA-G* disparaît des cellules du cytotrophoblaste extravilleux lors d'une affection sévère de fin de gestation appelée pré-éclampsie, caractérisée notamment par des troubles de la circulation placentaire [29].

La molécule HLA-G présente des peptides endogènes

Plusieurs caractéristiques structurales de *HLA-G* laissent présager une fonction de présentation de peptides, en particulier la très forte conservation des résidus d'ancrage des portions amino- et carboxy-terminales des ligands peptidiques. Ces résidus sont d'ailleurs parfaitement conservés chez l'homme, le poulet, le xénope [30]. La comparaison des séquences des molécules *HLA* de classe I classiques a montré la conservation, dans les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$, de dix acides aminés ayant des chaînes latérales pointant dans le sillon peptidique et dont on pense qu'ils servent à la fixation des peptides et à leur présentation aux TCR [31]. Neuf de ces dix acides aminés sont présents sur la molécule *HLA-G* [7], ce qui suggérerait, il y a déjà plusieurs années, que *HLA-G* pouvait fixer et présenter des peptides [22]. Deux études récentes effectuées simultanément dans les laboratoires de D. Geraghty à Seattle [10] et de H. G. Rammensee à Heidelberg (Allemagne) [32] aboutissant à des conclusions similaires ont apporté la preuve que les molécules *HLA-G*, membranaires et solubles (isoformes complètes), comme celles de classe I classiques, ont en effet la capacité de fixer des peptides nonamériques dérivés d'une multitude de protéines intracellulaires. Comme les molécules *HLA* de classe I classiques, les molécules *HLA-G* présentent des peptides avec un motif de séquences XI/LPXXXXXI*. Ces motifs peptidiques reconnus par *HLA-G* présentent des sites d'ancrages en position 2 (leucine ou isoleucine), position 3 (proline) et position carboxy-terminale 9 (leucine). Deux des trois sites d'ancrage sont suffisants pour une fixation sur *HLA-G*. Les poches à peptides de *HLA-A2* et de *HLA-G* reconnaissent les sites d'ancrages en positions 2 et 9. La préférence de *HLA-G* pour fixer des peptides nonamériques suggère une conservation des poches A et F. Lorsqu'ont été comparés les profils HPLC (*high performance liquid chromatography*) des

* où I = Ileu, L = Leu, P = Pro, X = n'importe quel acide aminé.

peptides élués de HLA-G à ceux dérivés de HLA-A2, on a estimé que la diversité des premiers était environ 5 fois moins importante [10]. Les molécules HLA-G ont donc la capacité de présenter des peptides exactement comme les molécules HLA de classe I classiques. HLA-G, par une telle présentation de peptides antigéniques aux cellules T à récepteurs $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$, pourrait ainsi participer à la réponse immunitaire envers des agents pathogènes transmis de la mère au fœtus pendant la gestation à travers le placenta. La sélection d'un répertoire de cellules T restreintes par HLA-G* impliquerait que HLA-G fût exprimé dans le thymus, ce qui pour l'instant n'est qu'une hypothèse. Toutefois, une étude récente réalisée sur des souris triple transgéniques exprimant les transgènes HLA-G, $\beta 2m$ et CD8 α humains a démontré la présence de HLA-G sur les cellules épithéliales thymiques [33]. Les molécules HLA-G codées par ces transgènes fonctionnent comme des éléments de restriction puisqu'une immunisation de ces animaux transgéniques avec un peptide qui se fixe spécifiquement sur HLA-G induit une réponse T cytotoxique spécifiquement dirigée contre les cellules cibles qui expriment HLA-G [33]. Les auteurs de cette étude en concluent que les molécules HLA-G ont des propriétés immunologiques identiques à celles des molécules HLA de classe I classiques lorsqu'elles sont exprimées dans des souris transgéniques. Alternativement, d'autres cellules T d'origine extrathymique pourraient également interagir avec HLA-G.

La molécule HLA-G est reconnue par des récepteurs de type NK

Les cellules NK humaines reconnaissent les molécules HLA de classe I classiques exprimées à la surface des cellules normales en utilisant deux types de récepteurs de structure différente [5]. Les premiers types de récepteurs possèdent des domaines

extracellulaires appartenant à la superfamille des immunoglobulines (Ig). Le plus souvent de type inhibiteur (KIR pour *killer-cell inhibitory receptor*), ils sont spécifiques des groupes de molécules HLA-C (p58.1, p58.2), HLA-B (p70) ou HLA-A (p70/p140) (*m/s n° 12, vol. 13, p. 1494*) [6]. Les acides aminés de HLA-B et de HLA-C reconnus par les KIR sont localisés en positions 77-83 du domaine externe $\alpha 1$, à proximité du site de glycosylation. Les seconds types de récepteurs (CD94) sont composés de glycoprotéines membranaires de type II contenant des domaines de type lectines-C. La molécule CD94 peut s'associer de manière covalente à la molécule NKG2-A appartenant à la famille NKG de type lectine-C et former un hétérodimère CD94/NKG2-A [34]. Ils reconnaissent différents allèles HLA de classe I et ont des effets à la fois inhibiteurs ou stimulateurs [6]. La perte d'expression d'un ou de plusieurs allèles *HLA* de classe I (notamment sur les cellules tumorales et les cellules infectées par des virus) entraîne la lyse des cellules cibles par les cellules NK. Des récepteurs de type activateur (KAR pour *killer-cell activating receptor*) ont également été détectés.

La nature des récepteurs NK reconnus par HLA-G n'est pas encore clarifiée et fait l'objet pour l'instant de résultats contradictoires. Des résultats récents ont ainsi montré que l'expression de HLA-G à la surface de transfectants d'origine lymphoblastoïde pouvait prévenir la lyse par des cellules NK dérivées du sang périphérique et possédant des récepteurs p58.1 ou p58.2 spécifiques, respectivement, des molécules de type HLA-Cw4 et Cw3 et que cette inhibition pouvait être levée par l'ajout d'anticorps dirigés contre p58-1 ou p58-2 [35]. Ces résultats suggéraient que HLA-G pouvait fonctionner comme un ligand des KIR p58.1 et p58.2. Ils restent toutefois à confirmer. D'autres laboratoires ont en effet constaté que peu de clones NK exprimant les récepteurs p58 étaient inhibés par HLA-G et qu'ils ne l'étaient qu'à de forts rapports effecteurs/cibles, suggérant que HLA-G ne serait qu'un ligand de faible affinité pour les KIR spécifiques de HLA-C [38]. D'autres équipes ont montré

que l'activité lytique de clones NK exprimant CD94/NKG2-A pouvait être inhibée par la présence de HLA-G et que des anticorps dirigés, soit contre CD94, soit contre le complexe CD94/NKG2-A restauraient complètement la lyse [34, 37]. Ces résultats différents, tous comme ceux de Münz *et al.* (Tübingen, Allemagne) [38] montrant que les récepteurs NK de type p70 (ou NKAT3) pouvaient également reconnaître HLA-G, ont toutefois un point commun : ils montrent que la molécule HLA-G peut être reconnue par des récepteurs NK et qu'à la suite de cette interaction récepteurs/ligands, des signaux inhibiteurs induisent le blocage de l'activité cytolytique. Il reste néanmoins à déterminer s'il existe également des récepteurs spécifiques de HLA-G à l'exclusion de toute autre molécule HLA de classe I. Des résultats récents obtenus par le groupe de A. et L. Moretta (Gênes, Italie) semblent l'indiquer [37] : certains clones NK (rares) isolés du sang périphérique, n'exprimant pas le complexe CD94/NKG2-A, reconnaissent HLA-G de façon spécifique. De tels clones sont incapables de lyser des transfectants HLA-G. L'ajout d'anticorps anti-HLA de classe I lève cette inhibition. Ces clones expriment également le récepteur inhibiteur p58.2 reconnaissant Cw3 mais l'ajout d'un anticorps dirigé contre p58.2 ne prévient pas le blocage de la lyse contre les transfectants HLA-G [37]. La nature de ce récepteur potentiellement spécifique de HLA-G est pour l'instant inconnue. La présence de récepteurs NK de type activateur et spécifique de HLA-G a également été démontrée. De tels clones NK ayant cette propriété fonctionnelle sont caractérisés par un phénotype CD94⁺/NKG2-A⁻ [37]. Un anticorps monoclonal spécifique de CD94 inverse cette activité stimulatrice. L'ensemble des données mentionnées ci-dessus concernant l'existence d'un certain nombre de récepteurs NK capables de reconnaître HLA-G est résumée dans le *Tableau I*.

Tous ces résultats sont importants dans le contexte de la gestation où les cellules du cytotrophoblaste extravilleux qui constituent l'interface fœto-maternelle au niveau de la décidua n'expriment pas de molécules HLA-A, -B et pourraient donc

* La restriction par les molécules du CMH est le phénomène par lequel les cellules T ne reconnaissent que les peptides antigéniques présentés par les molécules du CMH du soi.

être lysées par les cellules NK CD56⁺ CD3⁻ CD16⁻ présentes en abondance dans les tissus décidaux maternels, particulièrement au site d'implantation [21]. Il est à noter que CD94 est exprimé à des niveaux élevés par toutes ces cellules CD56⁺ présentes dans la décidua [21]. L'expression de HLA-G à la surface des cellules du cytotrophoblaste extravilleux devrait donc les protéger de la lyse NK. Il a été en effet montré par le groupe de YW Loke à Cambridge (GB) que HLA-G pouvait inhiber l'activité NK des grands lymphocytes granulaires décidaux contre les cellules du cytotrophoblaste extravilleux durant le premier trimestre de grossesse [39]. Toutefois, l'inhibition de la lyse observée était toujours partielle. L'influence éventuelle des peptides présentés par HLA-G dans leur reconnaissance par des récepteurs NK reste également à déterminer.

Des gènes de type HLA-G like ont été détectés dans d'autres espèces de mammifères

Un des arguments fréquemment avancé pour étayer l'hypothèse du caractère non fonctionnel du gène *HLA-G* était l'absence de gènes homologues chez d'autres mammifères et, en particulier, chez la souris. En fait, un article récent vient de décrire un nouveau gène de classe I murin dont les propriétés en font un bon candidat pour être un homologue murin de *HLA-G* [40]. Le criblage d'une banque d'ADNc provenant de blastocystes murins pré-

implantatoires a permis d'identifier et de caractériser un nouveau gène de classe I exprimé (au niveau transcriptionnel) dans le blastocyste ainsi que dans le placenta. Ce gène, dont l'appellation proposée est *blastocyst MHC*, est présent dans différentes souches de souris d'haplotypes CMH de classe I différents, y compris dans une espèce de souris (*Mus spreticus*) qui a divergé de *Mus musculus* il y a 3 millions d'années. D'autres caractéristiques le font ressembler à *HLA-G*, en particulier son domaine cytoplasmique tronqué. La séquence en acides aminés du produit de ce gène possède toutes les caractéristiques d'un domaine fonctionnel de présentation antigénique, en particulier une conservation des résidus des poches A et F qui assurent l'orientation des parties terminales -COOH et -NH₂ des peptides ligands. Des analogues de *HLA-G* ont également été décrits dans deux espèces de singes, le Tamarin et le singe Rhésus. Chez le singe du Nouveau Monde tamarin (*Saguinus oedipus*), les gènes du CMH de classe I exprimés, bien qu'ils codent pour une queue cytoplasmique non tronquée et présentent un polymorphisme très limité, ont une séquence plus proche de *HLA-G* que des gènes *HLA-A, B, C* [41]. Ces singes sont tout à fait capables de déclencher des réponses cytotoxiques CD8⁺, ce qui suggère que leurs molécules de classe I fonctionnent comme éléments de restriction d'une manière similaire aux molécules de classe I classiques. Les molécules de classe I de ce singe fonctionnent comme récepteurs de peptides

mais les positions des sites d'ancrage ne sont pas conservées par rapport à *HLA-G* [31]. Chez le singe rhésus (*Macaca mulata*), l'orthologue de *HLA-G*, *mamu-G*, est un pseudogène contenant plusieurs codons stop [42]. Mais il a également été récemment décrit chez ce singe un nouveau locus, proche de *HLA-A2*, mais présentant plusieurs caractéristiques de *HLA-G*: un codon stop dans l'exon 6 entraînant la traduction d'une queue cytoplasmique courte; des isoformes transcriptionnelles similaires à celles de *HLA-G* avec, en particulier, des épissages alternatifs de l'exon 3 ou de l'exon 3 et de l'exon 4; une expression placentaire. Ce gène a été dénommé pour ces raisons *Mamu-AG* [42]. Il semble donc qu'un certain nombre d'espèces de mammifères possèdent des gènes du CMH de classe I proches de *HLA-G* par leur structure et la localisation placentaire de leurs produits d'expression. Il reste toutefois à déterminer leur importance fonctionnelle, en particulier au cours de la gestation.

Conclusions

Bien que le rôle de *HLA-G* au cours de la gestation, et en particulier de ses différentes isoformes traductionnelles, reste encore à démontrer, les données récentes prouvant, d'une part, que la molécule *HLA-G* a la capacité de présenter des peptides et, d'autre part, qu'elle peut être reconnue par des récepteurs de type NK suggèrent une dualité fonctionnelle: prévention d'une réaction allogénique maternelle antipaternelle et protection du fœtus contre une infection transplacentaire. Une fonction de *HLA-G* autre que celle de présentation peptidique ou de ligand de certains récepteurs NK (c'est-à-dire autre qu'une fonction immunologique) ne peut être exclue pour le moment, en particulier pour les isoformes courtes. Les critères utilisés jusqu'alors pour définir l'appartenance d'un gène du CMH de classe I à la famille des non classiques (absence de polymorphisme, distribution tissulaire restreinte, absence de fonction) ne semblent plus tout à fait appropriés au gène *HLA-G*. Outre son polymorphisme, certes plus limité que celui des gènes *HLA-*

Tableau I
RÉCEPTEURS NK RECONNAISSANT HLA-G

Récepteurs des cellules NK	Fonctions	Ligands HLA de classe I classiques	Références
p58.1	KIR	HLA-C (Cw4)	[35]
p58.2	KIR	HLA-C (Cw3)	[35]
p70	KIR	HLA-B (Bw4)	[38]
CD94 ⁺ /NKG2-A ⁺	KIR	HLA-A,-B(Bw6),-C	[34,37]
^a CD94 ⁺ /NKG2-A ⁻	KAR	HLA-A,-B,-C	[37]
^b CD94/NKG2-A/p58.2 ⁺	KIR	HLA-C (Cw3)	[37]

a. Les clones exprimant la forme activatrice du récepteur CD94 co-expriment un ou plusieurs KIR de la superfamille des immunoglobulines ; b. l'addition d'un anticorps anti-p58.2 restaure la lyse du transfectant Cw3 par ce clone NK mais pas celle du transfectant HLA-G [37], suggérant qu'il existe un récepteur NK spécifique de HLA-G différent du récepteur p58.2. KIR : killer-cell inhibitory receptor, KAR : killer-cell activating receptor.

A et -B, la détection de gènes analogues dans d'autres espèces de mammifères, son expression tissulaire non restreinte aux seules cellules du cytotrophoblaste extravilloux, enfin et surtout les récentes données fonctionnelles démontrent que *HLA-G* présente certaines des caractéristiques des gènes du CMH de classe I classiques. L'information peut-être la plus importante est que les quatre types de récepteurs des molécules du CMH de classe I classiques qui sont présents à la surface des CTL et des cellules NK (TCR, co-récepteur CD8, KIR, KAR de type Ig ou lectines) semblent également capables de reconnaître HLA-G. Il est donc permis de définir le gène *HLA-G* comme étant « la plus classique des non classiques » ■

* **ABRÉVIATIONS** *

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité.

CTL : lymphocytes T cytotoxiques (cytotoxic T lymphocytes).

Ig : immunoglobuline.

KAR : récepteur NK de type activateur (killer-cell activating receptor).

KIR : récepteur NK de type inhibiteur (killer-cell inhibitory receptor).

NK : natural killer.

TCR : récepteur de l'antigène des lymphocytes T (T-cell receptor).

Remerciements

Les recherches réalisées dans le laboratoire des auteurs ont bénéficié du soutien de l'Inserm, de l'ARC, de la FNCLCC et du Conseil Régional Midi-Pyrénées. Nous remercions les obstétriciens de Toulouse avec qui nous collaborons et en particulier les Drs A. Berebbi, B. Grandjean, C. Levade et M. Périneau ainsi que Maryse Aguerre-Girr pour son aide technique précieuse.

RÉFÉRENCES

1. Pichon L, Giffon T, Chauvel B, Le Gall J, David V. La région HLA de classe I du CMH : une des régions les plus complexes du génome humain ? *Med Sci* 1996; 12: 1209-18.

2. Bodmer JG, Marsh GE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop R, Charron D, Dupont B, Erlich HA, Fauchet R, Mach B, Mav WR, Parham P, Sasazuki T, Schreuder GMTh, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI. Nomenclature for factors of the HLA system, 1996. *Hum Immunol* 1997; 53: 98-128.

3. Le Bouteiller P. HLA class I chromosomal region, genes and products: facts and questions. *Crit Rev Immunol* 1994; 14: 89-129.

4. Lotteau V. Prix Nobel de médecine à Peter C. Doherty et Rolf M. Zinkernagel. La restriction de la réponse immunitaire par le complexe majeur d'histocompatibilité. *Med Sci* 1996; 12: 1316-8.

5. Vély F, Vivier E. Mécanismes moléculaires de la cytotoxicité des cellules NK. *Med Sci* 1996; 12: 458-64.

6. Moretta A, Biassoni R, Bottino C, Pende D, Vitale M, Poggi A, Mingari MC, Moretta L. Major Histocompatibility complex class I-specific receptors on human natural killer and T lymphocytes. *Immunol Rev* 1997; 155: 105-17.

7. Geraghty D, Koller BH, Orr HT. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9145-49.

8. Loke YW, King A. Human implantation: cell biology and immunology. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.

9. Fujii T, Ishitani A, Geraghty DE. A soluble form of the HLA-G antigen is encoded by a messenger ribonucleic acid containing intron 4. *J Immunol* 1994; 153: 5516-24.

10. Lee N, Malacko AR, Ishitani MC, Chen J, Bajorath H, Marquardt H, Geraghty DE. The membrane-bound and soluble forms of HLA-G bind identical sets of endogenous peptides but differ with respect to TAP association. *Immunity* 1995; 5: 591-600.

11. Kirszenbaum M, Moreau P, Gluckman E, Dausset J, Carosella E. An alternatively spliced form of HLA-G mRNA in human trophoblasts and evidence for the presence of HLA-G transcripts in adult lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4209-13.

12. Schmidt CM, Orr HT. HLA-G transgenic mice: a model for studying expression and function at the maternal/fetal interface. *Immunol Rev* 1995; 147: 53-65.

13. Moreau P, Paul P, Gourand L, Prost S, Dausset J, Carosella E, Kirszenbaum M. HLA-G gene transcriptional regulation in trophoblasts and blood cells. Differential binding of nuclear factors to a regulatory element located 1.1 kb from exon 1. *Hum Immunol* 1997; 52: 41-6.

14. Van der Ven K, Ober C. HLA-G polymorphism in African Americans. *J Immunol* 1994; 153: 5628-33.

15. Yamashita T, Fujii T, Watanabe Y, Tokunaga K, Tadokoro K, Uji T, Taketani Y. HLA-G gene polymorphism in a Japanese population. *Immunogenetics* 1996; 44: 186-91.

16. Ober C, Rosinski B, Grimsley C, van der Ven K, Robertson A, Runge A. Population genetic studies of HLA-G: allele frequencies and linkage disequilibrium with HLA-A. *J Reprod Immunol* 1996; 32: 111-23.

17. Alizadeh M, Legras C, Semana G, Le Bouteiller P, Genetet B, Fauchet R. Evidence for polymorphism of HLA-G gene. *Hum Immunol* 1993; 38: 206-12.

18. Morales P, Corell A, Martinez-Laso J, Martin-Villa JM, Varela P, Paz-Artal E, Allende LM, Arnaiz-Villena A. Three new HLA-G alleles and their linkage disequilibrium with HLA-A. *Immunogenetics* 1993; 38: 323-31.

19. Ellis SA, Palmer MS, McMichael AJ. Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA class I molecule. *J Immunol* 1990; 144: 731-35.

20. Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine MF, Fisher SJ, DeMars R. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblast. *Science* 1990; 248: 220-23.

21. King A, Loke YW, Chaouat G. NK cells and reproduction. *Immunol Today* 1997; 18: 64-6.

22. Le Bouteiller P, Lenfant F. Antigen-presenting function(s) of the non-classical HLA-E, -F and -G class I molecules: the beginning of a story. *Res Immunol* 1996; 147: 301-13.

23. Bensussan A., Mansur IG, Mallet V, Rodriguez AM, Girr M, Weiss EH, Brem G, Boumsell L, Gluckman E, Dausset J, Carosella E, Le Bouteiller P. Detection of membrane-bound HLA-G translated products with a specific monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 10292-6.

24. Onno M, Guillaudeux T, Amiot L, Renard I, Drenou B, Hirel B, Girr M, Semana G, Le Bouteiller P, Fauchet R. The HLA-G gene is expressed at a low mRNA level in different human cells and tissues. *Hum Immunol* 1994; 41: 79-86.

25. Kirszenbaum M, Moreau P, Teysier M, Lafon C, Gluckman E, Dausset J, Carosella E. Evidence for the presence of the alternatively spliced HLA-G mRNA forms in human mononuclear cells from peripheral blood and umbilical cord blood. *Hum Immunol* 1995; 43: 237-41.

26. Hammer A, Hutter H, Blaschitz A, Mahner W, Hartmann M, Uchanska-Ziegler B, Ziegler A, Dohr G. Amnion epithelial cells, in contrast to trophoblast cells, express all classical HLA class I molecules together with HLA-G. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37: 161-71.

27. Jurisicova A, Casper RF, Maclusky NJ, Mills GB, Librach CL. HLA-G expression during preimplantation human embryo development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 161-5.

28. Yang Y, Chu W, Geraghty DE, Hunt JS. Expression of HLA-G in human mononuclear phagocytes and selective induction by IFN- γ . *J Immunol* 1996; 156: 4224-31.

29. Taylor RN. Review: immunobiology of preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37: 79-86.

30. Salter-Cid L, Flajnik MF. Evolution and developmental regulation of the Major Histocompatibility Complex. *Crit Rev Immunol* 1995; 15: 31-75.

RÉFÉRENCES

31. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennet WS, Strominger JL, Wiley DC. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 1987; 329: 512-18.
32. Diehl M, Münz C, Keilholz W, Stevanovic S, Holmes N, Loke YW, Rammensee HG. Non-classical HLA-G molecules are classical peptide presenters. *Curr Biol* 1996; 6: 305-14.
33. Horuzsko A, Antoniou J, Tomlinson P, Portik-Dobos V, Mellor AL. HLA-G functions as a restriction element and a transplantation antigen in mice. *Int Immunol* 1991; 9: 645-53.
34. Pérez-Villar JJ, Melero I, Navarro F, Carretero M, Bellón T, Llano M, Colonna M, Geraghty D, Lopez-Bottet M. The CD94/NKG2-A inhibitory receptor complex is involved in NK cell-mediated recognition of cells expressing HLA-G1. *J Immunol* 1997; 158: 5736-43.
35. Pazmany L, Mandelboim O, Valès-Gomez M, Davis DM, Reyburn HT, Strominger JL. Protection from natural killer cell-mediated lysis by HLA-G expression on target cells. *Science* 1996; 274: 792-5.
36. Colonna M. Specificity and function of immunoglobulin superfamily NK cell inhibitory and stimulatory receptors. *Immunol Rev* 1997; 155: 127-33.
37. Pende D, Sivori S, Accame L, Pareti L, Falco M, Geraghty D, Le Bouteiller P, Moretta L, Moretta A. HLA-G recognition by human natural killer cells. Involvement of CD94 both as inhibitory and as activating receptor complex. *Eur J Immunol* 1997; 27: 1875-80.
38. Münz C, Holmes N, King A, Loke YW, Colonna M, Schild H, Rammensee HG. Human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G molecules inhibit NKAT3 expressing natural killer cells. *J Exp Med* 1997; 185: 385-91.
39. Chumbley G, King A, Robertson K, Holmes N, Loke YW. Resistance of HLA-G and HLA-A2 transfectants to lysis by decidual NK cells. *Cell Immunol* 1994; 155: 312-22.
40. Sipes SL, Medaglia V, Stabley DL, DeBruyn CS, Alden MS, Catenacci V, Landel CP. A new major histocompatibility complex class Ib gene expressed in the mouse blastocyst and placenta. *Immunogenetics* 1996; 45: 108-20.
41. Watkins DI, Chen ZW, Hugues AL, Evans MG, Tedder TF, Levin NL. Evolution of the MHC class I genes of a New World primate from ancestral homologues of human nonclassical genes. *Nature* 1990; 346: 60-3.
42. Boyson JE, Iwanaga KK, Golos TG, Watkins D. Identification of the rhesus monkey HLA-G ortholog: *Mamu-G* is a pseudogene. *J Immunol* 1997; 157: 5428-37.

TIRÉS À PART

P. Le Bouteiller.

Summary

HLA-G gene : the more classical among the non-classical

HLA-G is a human MHC class I gene so far considered as non classical, due to its low polymorphism, its trophoblast restricted tissue distribution during pregnancy and its absence of defined functions. A number of recent data clearly show that these three criteria are no longer applicable and that *HLA-G* is more and more like the classical *HLA* class I genes. Firstly, apart a shorter cytoplasmic tail, there is nothing unique about the overall structure of the full length *HLA-G* protein isoform with the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ external domains forming a peptide binding pocket, a $\beta 2m$ -associated $\alpha 3$ domain and the transmembrane and cytoplasmic domains. Secondly, it appears that *HLA-G* is not oligomorphic. Between three to six different alleles at the amino acid level have been described according to the population studied and many more allelic forms at the nucleotide level due to nonsynonymous substitutions. Moreover, a striking linkage disequilibrium between *HLA-G* and *HLA-A* alleles have been reported. Thirdly, it appears that *HLA-G* could be expressed at the protein level in other cell types than extravillous cytotrophoblast cells including blastocyst, some villous trophoblast cells, amnion epithelial cells. Fourthly, the two major functional properties attributed to the classical HLA class I molecules that are 1) restricting element presenting foreign peptides to the T cell receptor of CD8⁺ cytotoxic T cells and 2) ligand of different inhibitory or stimulatory NK cell receptors inducing either inhibition or stimulation of NK cell lysis, have also been demonstrated for *HLA-G*. It was shown that *HLA-G* is capable of binding endogenously processed nonamer peptides and that, in *HLA-G* transgenic mice, *HLA-G* functions as a restricting element in a cytotoxic T cell response. Although not completely clarified, a number of different NK cell receptors of both the immunoglobulin and lectin families have been shown to recognize *HLA-G* and to exhibit either a stimulatory or inhibitory function. These data were obtained on NK cells derived from peripheral blood. We are awaiting similar experiments performed on decidual NK clones that are present at the materno-fetal interface during pregnancy. All of these recent data allow us to propose that « the *HLA-G* gene is the more classical among the non-classical ».