
UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

**IMPLICATION DES CELLULES DU SYSTÈME IMMUNITAIRE
DANS LA PATHOGENÈSE DE L'INFERTILITÉ FÉMININE**

par

Marie-Hélène Lachapelle

Département d'obstétrique-gynécologie
et
Département de Médecine

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctor (Ph.D.)

en sciences biomédicales

Août 1997

© Marie-Hélène Lachapelle, 1997



W

4

U58

1998

V.041

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

DANS LA PATHOGENÈSE DE L'INFERTILITÉ FÉMININE
IMPACTS DES CELLULES DU SYSTÈME IMMUNITAIRE

par

Ministère de la Santé

Département de Médecine-Prévention

et

Département de Santé

Publicité de Santé

Thèse de médecine (M.D.)

Le jury de la thèse est composé de

M. le Professeur Jean-Pierre

et M. le Professeur



1998

© Université de Montréal, 1998

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

FACULTÉ DES ÉTUDES SUPÉRIEURES

Cette thèse intitulée:

**"IMPLICATION DES CELLULES DU SYSTÈME IMMUNITAIRE
DANS LA PATHOGENÈSE DE L'INFERTILITÉ FÉMININE"**

Présentée par:

Marie-Hélène Lachapelle

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Puttaswamy Manjunath (Président-rapporteur)
Denis-Claude Roy (Directeur de recherche)
Pierre Miron (Codirecteur)
Marika Sarfati (Membre du jury)
Sylvie St-Jacques (Examineur externe)
Michèle Brochu (Représentant du doyen)

Thèse acceptée le:

16.02.1998

TABLE DES MATIÈRES

Liste des tableaux	v
Liste des figures.....	vi
Liste des sigles et abréviations.....	vii
Sommaire.....	x
1 Introduction.....	1
1.1 L'infertilité	1
1.1.1 Facteurs affectant la fécondité féminine	1
1.1.1.1 Facteurs ovariens	3
1.1.1.2 Facteurs utérins.....	5
1.1.1.3 Facteurs tubaires	7
1.1.1.4 Facteurs cervicaux	10
1.1.2 Infertilité idiopathique	10
1.2 Avortements à répétition	12
1.2.1 Facteurs immunologiques	15
1.2.1.1 Causes humorales	16
1.2.1.2 Causes cellulaires.....	18
1.3 L'endométriose.....	20
1.3.1 Classification de l'endométriose	23
1.3.2 Méthode de diagnostic de l'endométriose	23
1.3.3 L'infertilité associée à l'endométriose	27
1.3.4 Endométriose; dysfonction immunologique.....	29

1.4	L'immunologie de la reproduction	31
1.4.1	L'immunologie humorale	32
1.4.2	L'immunologie cellulaire.....	33
1.4.3	Cellules 'Natural Killer' (NK)	34
1.4.3.1	Activité cytolytique des cellules NK	37
1.4.3.2	Cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC)	39
1.5	L'endomètre	39
1.5.1	Méthode d'évaluation de l'endomètre	43
1.6	Liquide folliculaire	45
1.7	But du travail	49
2.	Résultats.....	51
2.1	Publication #1:Flow-cytometric characterization of hematopoietic cells in non-pregnant human endometrium.....	53
2.2	Publication #2: Endometrial T, B and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion: Altered profile and pregnancy outcome	62
2.3	Publication #3: Differential involvement of endometrial lymphocytes in infertile patients with endometriosis	70
2.4	Publication #4: Flow-cytometric evaluation of leukocyte subpopulations in the follicular fluids of infertile patients	111
3.	Discussion.....	117
4.	Conclusions.....	134
5.	Bibliographie.....	139

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Facteurs affectant la fertilité	2
Tableau II	Procédure de diagnostic de l'infertilité chez la femme	4
Tableau III	Causes de synéchies intrautérines	6
Tableau IV	Facteurs explicatifs de l'infertilité idiopathique	11
Tableau V	Étiologie des avortements à répétition.....	14
Tableau VI	Théories proposées sur la pathogenèse de l'endométriose	21
Tableau VII	Caractéristiques des cellules NK	36
Tableau VIII	Avantages de la cytométrie en flux	120

LISTE DES FIGURES

Figure 1:	Anomalies utérines.....	8
Figure 2:	Grille d'évaluation de l'endométriose	24
Figure 3:	Cytomètre en flux.....	46
Figure 4:	Mécanisme hypothétique impliqué dans l'avortement à répétition	123

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

Ac	Anticorps
ADCC	Antibody dependant cell cytotoxicity
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPc	Adenosine monophosphate cyclic
APC	Cellule présentatrice d'antigène
AR	Avortement à répétition
CA-125	Cancer antigen 125
CAM	Cell adhesion molecule
CD	Cluster designation
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CSF-1	Colony stimulating factor 1
DES	Diethylstilbestrol
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FcR γ III	Récepteur γ III du fragment Fc
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FIV-ET	Fécondation in vitro et transfert d'embryon
FSH	Folliculostatine
GF	Growth factor
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone
HBsAg	Antigène de l'hépatite B
hCG	Gonadotropine chorionique humaine

HLA	Human leukocyte antigen
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule-1
IFN- γ	Interféron- γ
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen-1
LGL	Large granular lymphocyte
LH	Hormone luténique
LIF	Lymphocyte inhibiting factor
LUF	Luteinized unruptured follicle
MRI	Imagerie par résonance magnétique
MTS	Maladie transmise sexuellement
NK	Natural killer cells
OC-125	Anticorps contre le CA-125
OCI	Oocyte capture inhibitor
PBL	Peripheral blood lymphocyte
PE	Phycoerythrin
PIIINP	Propeptide aminoterminal du procollagène III
PMN	Polymorphonucléaire
PP14	Protéine placentaire 14
RD	Rhodamine
TGF- β	Transforming growth factor β

Th	Lymphocyte T helper
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
Ts	Lymphocyte T supprimeur
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VLA	Very late antigen

SOMMAIRE

Le problème de l'infertilité humaine occupe une place grandissante dans le monde médical. Une attention particulière est réservée à l'infertilité féminine dans le domaine de la recherche, puisque les méthodes diagnostiques ainsi que les nouvelles technologies de reproduction sont loin d'être optimum pour remédier à ce problème. Effectivement, l'étiologie de l'infertilité chez la femme n'est pas connue dans 40% des cas. L'immunologie de la reproduction est un domaine de recherche de plus en plus exploité et le système immunitaire est souvent pointé comme principal responsable lorsqu'aucune cause d'infertilité n'est trouvée.

Cette étude vise à développer de nouvelles stratégies nous permettant d'approfondir les connaissances sur le rôle des cellules du système immunitaire dans le tractus génital féminin. De plus, cette étude vise à investiguer les populations hématopoiétiques présentes chez les femmes souffrant de différentes pathologies affectant la fertilité. Dans un premier temps, afin d'investiguer la contribution immunologique des cellules lymphoïdes de l'endomètre humain non-gestant, nous avons dû mettre au point une méthodologie permettant l'enrichissement des cellules hématopoiétiques endométriales ainsi que leur caractérisation. Une biopsie de l'endomètre obtenue en phase sécrétoire est d'abord dissociée mécaniquement, puis la majorité des cellules glandulaires sont éliminées par des filtrations séquentielles. Par la suite, la caractérisation des cellules hématopoiétiques est faite par marquage avec des anticorps monoclonaux spécifiques aux populations cellulaires que nous voulons évaluer et les anticorps fixés sur les cellules sont détectés soit par des méthodes immunocytologiques, soit

par cytométrie en flux. Cette dernière méthode s'est révélée hautement reproductible, rapide et facile à utiliser. Dans un deuxième temps, nous avons évalué les différentes populations leucocytaires présentes dans l'endomètre non-gestant de femmes fertiles. Ceci nous a permis de valider notre méthodologie et d'obtenir les valeurs de référence des populations immunes normales avant d'étudier les cellules des femmes souffrant d'infertilité.

Nous avons ensuite investigué des patientes ayant un phénomène d'avortement à répétition idiopathique et identifié les modifications immunophénotypiques des cellules hématopoiétiques de leur endomètre non-gestant. En effet, nous démontrons que ces patientes ont un déficit de lymphocytes T suppresseurs/cytotoxiques endométriaux et une augmentation des lymphocytes B. Également, elles présentent une augmentation de la population de cellules NK exprimant le récepteur Fc γ III, molécule associée aux cellules hautement cytotoxiques et potentiellement reliée au rejet immunologique du tissu foetal.

Nous évaluons également les mécanismes immunologiques impliqués dans trois autres catégories d'infertilité, à savoir: (i) endométriose, (ii) facteurs tubaires et (iii) infertilité inexplicée. Les patientes qui souffrent d'endométriose ont un déficit significatif en lymphocytes T endométriaux et par contre, une augmentation des cellules NK et des lymphocytes B. Ces modifications ne sont pas proportionnelles à la sévérité de l'endométriose bien qu'elles se retrouvent à tous les stades de la maladie. Il est particulièrement intéressant de noter que les patientes ayant des facteurs tubaires ont des modifications immunophénotypiques similaires à celles de patientes souffrant d'endométriose, c'est-à-dire

un déficit en lymphocytes T et une augmentation des cellules NK. Cependant, les lymphocytes B se situent à un niveau normal. Finalement, les proportions de populations leucocytaires endométriales de femmes souffrant d'infertilité inexplicée sont de façon surprenante, comparables à celles du groupe contrôle de femmes fertiles.

La dernière étape de cette recherche consiste à évaluer le rôle des lymphocytes et autres cellules immunes au niveau du liquide folliculaire de patientes infertiles causées par l'endométriose, les facteurs tubaires ou l'infertilité inexplicée. Le liquide folliculaire est obtenu de patientes soumises à une intervention thérapeutique de type fécondation in vitro. Dans un premier temps, nous démontrons que le stade de maturation du follicule ovarien n'a pas d'influence sur la proportion des différentes populations leucocytaires lorsque étudiées par une approche de flux cytométrie. Les patientes souffrant d'endométriose ont une augmentation des cellules NK et des lymphocytes B dans le liquide folliculaire, tel que retrouvé au niveau de l'endomètre. Mais en plus, elles présentent une augmentation significative de leurs monocytes dans ce liquide. Une augmentation des lymphocytes T dans le liquide folliculaire est la seule anomalie immunologique identifiée chez les patientes souffrant d'infertilité inexplicée. Les altérations des populations T, NK et B retrouvées tant au niveau de l'endomètre non-gestant que du liquide folliculaire, mais non au niveau du sang, suggère un dérèglement local de l'immunité cellulaire et humorale chez les patientes avec endométriose.

Grâce à la nouvelle méthodologie d'évaluation des populations leucocytaires que nous avons développée, nous avons pu identifier des modifications immunophénotypiques importantes dans l'endomètre et le liquide folliculaire des patientes atteintes des principales conditions associées à l'infertilité féminine. Ce phénomène de dérèglement immunologique pourrait altérer la fertilité de ces femmes et présente des implications étiopathogéniques majeures qui fournissent même des outils diagnostiques immédiats.

MOTS CLÉS: Infertilité, Endométriose, Avortements à répétition, Système immunitaire

1. INTRODUCTION

1.1 L'INFERTILITÉ

De façon surprenante, la fonction reproductrice chez l'humain est relativement peu efficace (March, 1991). En effet, des données expérimentales ont démontré qu'approximativement 15% des ovules inséminés ne se diviseront pas et qu'un autre 15% ne s'implanteront pas. En outre, certains résultats suggèrent que le taux de perte post-implantation pourrait aller jusqu'à 41% (Williamson, 1980). Par conséquent, dans des conditions optimales, moins de 30% des fécondations réussies conduiront à un foetus viable chez un couple fertile.

L'infertilité est généralement définie comme étant l'incapacité de procréer pour un couple après plus d'un an d'essai (Mishell, 1991). L'incidence de l'infertilité chez les couples canadiens est de 8.5% selon le rapport de la commission royale sur les nouvelles technologies de reproduction du gouvernement canadien présenté en 1993. Les causes de cette incapacité à concevoir sont très diverses (Tableau I). De plus, la causalité de l'infertilité est parfois la somme de plusieurs facteurs plus ou moins mineurs chez les deux conjoints. Le présent ouvrage ne traitera que d'infertilité féminine.

1.1.1 Facteurs affectant la fécondité féminine

Une cause de l'infertilité est le plus souvent rencontrée chez la femme (Tindall, 1987). Elle peut être d'origine ovarienne, tubaire, utérine, cervicale, ou autre. Les causes pelviennes

TABLEAU I
FACTEURS AFFECTANT LA FERTILITÉ

ORIGINE	PROPORTION
Anovulation/Dysovulation	10 à 15%
Facteur pelvien (endométriose, infection, autre)	30 à 40%
Facteur cervical	10 à 15%
Facteur mâle	30 à 40%
Idiopathique	10%

Adapté de: "Infertility, contraception & reproductive endocrinology" par Mishell, Davajan et Lobo (1991)

peuvent être la conséquence de maladies telles que salpingite, endométriose, tuberculose génitale, ou de désordres immunologiques. Comme les causes sont variées, les méthodes diagnostiques sont multiples et sont citées au Tableau II. Malgré une investigation approfondie, il n'en demeure pas moins que dans 10% des cas, l'origine de l'infertilité demeure énigmatique. Ainsi les études visant le développement de nouvelles avenues pour le dépistage et la compréhension des causes inexplicables d'infertilité ont un rôle très important dans notre société moderne actuelle.

1.1.1.1 Facteurs ovariens

Les facteurs ovulatoires peuvent représenter 25% des causes d'infertilité féminine. Les dysfonctions hypothalamiques et le syndrome des ovaires polykystiques sont les causes les plus fréquentes (Winston, 1993). De plus, il arrive que le désordre ovulatoire soit associé à d'autres dérèglements gonadotrophiques, comme dans le cas d'une hyperprolactinémie, d'une tumeur hypothalamique, ou encore, suite à une perte excessive de poids (anorexie) pouvant mener à une insuffisance hypothalamo-hypophysaire. Ces désordres sont souvent dus à une altération de l'action de la FSH sur les facteurs endocriniens ou paracrines. On retrouve aussi la ménopause prématurée due à des causes génétiques comme la dysgénésie gonadique (syndrome de Turner), suite à une chimiothérapie ou radiothérapie, ou associée à un phénomène autoimmunitaire (Syndrome de Savage) (Healy, 1994).

De façon générale, les facteurs ovariens sont facilement diagnostiqués et plusieurs thérapies sont présentement disponibles. Les thérapies sont généralement basées sur la prise de

TABLEAU II**PROCÉDURE DE DIAGNOSTIC DE L'INFERTILITÉ CHEZ LA FEMME**

- 1. Historique et examen physique complet**
 - 2. Bilan de base:**
 - formule sanguine complète**
 - anticorps anti-rubéole**
 - groupe sanguin + Rh**
 - sérologiques virales: VIH, HBsAg**
 - 3. Courbe de température basale**
 - 4. Hystérosalpingographie**
 - 5. Laparoscopie/Hystérocopie**
 - 6. Biopsie de l'endomètre**
 - 7. Anticorps antispermatozoïdes**
 - 8. Prolactine, TSH**
 - 9. Mycoplasme, ureaplasma urealyticum**
-

Modifié de: "Infertility and Reproductive Medicine" par Band (1991)

médicament comme la bromocriptine, le citrate de clomiphène, les gonadotrophines (FSH et LH) ou les analogues de GnRH, mais dans certains cas, le recours à la microchirurgie est très efficace (Winston, 1993). De plus, dans la majorité des cas, il est possible de rétablir l'ovulation et du même coup la fertilité.

1.1.1.2 Facteurs utérins

L'incidence exacte de l'infertilité causée par des anomalies utérines est inconnue. Elle est cependant estimée à environ 10% (March, 1991). Ce facteur est souvent la conséquence d'une maladie telle que la tuberculose génitale puisque, lorsqu'elle est extensive, l'endomètre est détruit et remplacé par du tissu conjonctif qui tapisse la cavité utérine et empêche l'implantation de l'embryon. La plupart des patientes atteintes sont aménorrhéiques. Des infections utérines d'autres types peuvent également être retrouvées, impliquant particulièrement les agents suivants: staphylocoque, streptocoque, E. coli, aérobactère, bactéroïdes fragilis et protéus, et sont généralement enrayerées par des traitements aux antibiotiques.

Les synéchies intra-utérines d'origine non-infectieuse peuvent aussi altérer la fécondité, par exemple, suite à un curetage lors d'endométrite post-partum ou après un avortement (Jensen, 1972). Il existe également plusieurs autres causes moins fréquentes de synéchies, notées au Tableau III.

Certaines anomalies congénitales peuvent aussi affecter la reproduction. Elles ne sont habituellement pas associées à l'infertilité primaire, mais plutôt aux avortements à répétition .

TABLEAU III

CAUSES DE SYNÉCHIES INTRA-UTÉRINES

ORIGINE	PROPORTION
TRAUMA ASSOCIÉ A LA GROSSESSE	
Curetage après avortement	67%
Curetage post-partum	22%
Césarienne	2%
TRAUMA SANS GROSSESSE	
Myomectomie	1%
Curetage diagnostique	1%
Manipulation cervicale	1%
AUCUN TRAUMA CONNU	2%
TUBERCULOSE GÉNITALE	4%

Adapté de: "Intra-uterine adhesions" par Schenker JG, Margalioth (1982)

En effet, les malformations utérines congénitales sont associées à un risque augmenté d'avortements spontanés, surtout au deuxième trimestre, ou à une diminution de la fertilité (Winston, 1993). Parmi les malformations utérines (Figure 1), on retrouve les septum utérins, les utérus bicornes, ou à cornes rudimentaires, ou encore, avec une seule corne. Une malformation qui donne l'aspect d'un T à la cavité utérine est peu commune et généralement due à une exposition au diethylstilbestrol (DES) durant la grossesse.

Les problèmes de fertilité associés à des facteurs utérins sont facilement identifiés en effectuant un examen par hystérosalpingographie ou par ultrasonographie. Mais généralement ces patientes ne disposent d'aucune thérapie ou technologie de reproduction pour obtenir une grossesse.

1.1.1.3 Facteurs tubaires

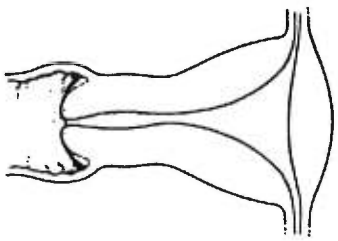
Les inflammations pelviennes sont couramment associées à l'infertilité (jusqu'à 15% des infertilités chez la femme). Elles peuvent causer une obstruction tubaire, un mauvais fonctionnement (altération de la muqueuse tubaire) ou, encore, la formation d'adhérences (Winston, 1993). Chacune de ces perturbations anatomiques peut troubler les mécanismes de capture de l'ovule ou le transport des gamètes et conduire à l'infertilité.

Les anomalies congénitales des trompes de Fallope sont rarement rencontrées et se présentent le plus souvent sous forme de développement incomplet ou absence tubaire. Par contre, des anomalies tubaires secondaires à une pathologie sont très fréquentes et souvent associées à l'infertilité ou aux grossesses ectopiques. Elles se présentent généralement sous forme

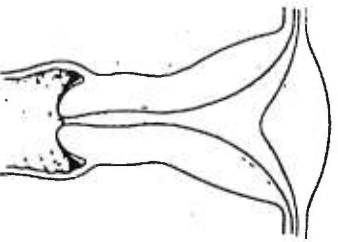
Figure 1

Anomalies utérines

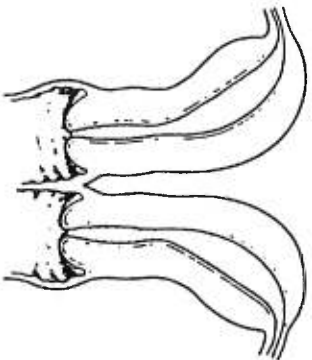
L'illustration ci-contre indique les différentes malformations utérines congénitales qui sont rencontrées. Ces malformations utérines sont associées à un risque augmenté d'avortement spontanés, ou à une diminution de la fertilité.



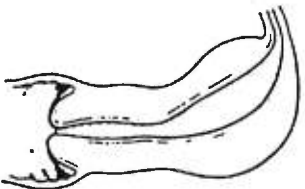
Normal



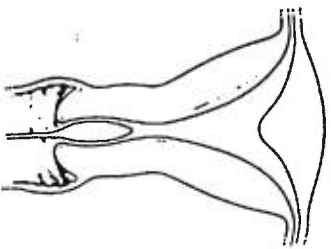
Arqué



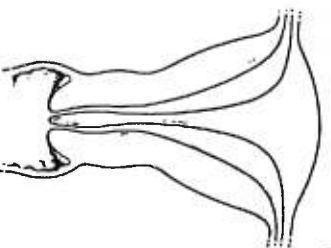
Didelphique



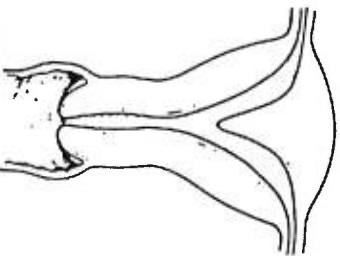
Unicorne



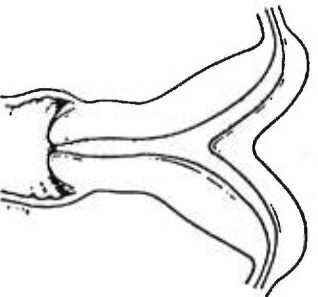
**Utérus
Cloisonné**



**Utérus et col
cloisonnés**



Cloisonné



Bicorne

d'obstruction de la lumière. Ainsi, elles peuvent être la conséquence d'une maladie inflammatoire, comme une MTS qui est l'un des agents causals le plus fréquent. Une infection pelvienne telle que l'appendicite est une autre source d'infection rencontrée surtout au niveau de la trompe droite. Il y a aussi des salpingites à chlamydia, à neisseria, à streptocoque, ou à staphylocoque. La guérison laisse souvent des séquelles très graves. Par exemple, suite à une salpingite aiguë, la trompe peut se transformer en hydrosalpinx, suite à l'agglutination des fimbriées, et mener à la destruction de l'endosalpinx. Il devient alors pratiquement impossible d'avoir une grossesse naturelle et cette patiente devra recourir à la reproduction médicalement assistée telle que la fécondation in vitro et le transfert d'embryon.

1.1.1.4 Facteurs cervicaux

Certaines patientes deviennent infertiles suite à une colonisation du col ou à un traitement au laser et ceci serait associé à une déficience de production du mucus (Winston, 1993).

1.1.2 Infertilité idiopathique.

L'incidence de l'infertilité idiopathique varie d'une clinique à l'autre et dépend souvent de la rigueur suivant laquelle l'investigation est conduite (Winston, 1993). Le tableau IV nous montre les facteurs qui ont été suggérés pour expliquer certaines causes d'infertilité inexplicée. Certains auteurs prétendent que, dans 30% des cas, ce serait un problème associé à une altération des fonctions du sperme. Les désordres endocriniens, comme une sécrétion inappropriée de LH, seraient présents dans 25% des cas idiopathiques. Une étude, menée dans un hôpital de Londres, a rapporté que chez environ 8% des patientes qui souffraient

TABLEAU IV

FACTEURS EXPLICATIFS DE L'INFERTILITÉ IDIOPATHIQUE

Sperme	Immunologique
Acide gras	Cervical
Anticorps	Endométrial
Motilité	Antigène ZP
Augmentation de la fibronectine	Anticorps circulant
Instabilité de la chromatine	Différences HLA
Infectieuse	Pelvienne
Chlamydia trachomatis	Endométriose
Gonorrhée	Syndrome de la non-rupture du
Ureaplasmas urealyticum	follicule
Mycoplasmas	Facteurs péritonéaux
Endocrinienne	Utérin
Insuffisance ou défaut de la phase	Cornes anormales anatomiquement
lutéale	Polypes cornuaires
Augmentation du taux de LH	Spasmes tubaires
(ovaires polykystiques)	Anomalie utérine
Dysthyroïdisme	Hypoplasie utérine
Hyperandrogénisme	Endométrite
Hyperprolactinémie	Fibromes
Psychogénique	Avortement inexpliqué
Génétique	(fausse couche biochimique)

Adapté de: "Infertility" par Winston (1993)

d'infertilité inexpliquée, on retrouvait une anomalie utérine congénitale qui contribuait à leur infertilité (Winston, 1993). Une étude suggère que certains facteurs de vie tels que la diète, l'exercice, l'alcoolisme, le tabagisme ainsi que la consommation de drogues, pourraient réduire la fécondité de certaines femmes (Skakkebaek, 1994). Également, le milieu de travail qui exposerait certaines femmes à des agents toxiques tels que l'oxyde nitreux, des colorants à textiles, le plomb, le mercure et le cadmium a été associé à l'infertilité (Rowland, 1992). Il est clair que dans le cas de l'infertilité inexpliquée, de nouveaux protocoles d'investigation seraient bienvenus afin d'en identifier les causes et optimalement en réduire l'incidence.

1.2 AVORTEMENTS À RÉPÉTITION

L'avortement spontané à répétition est l'une des complications les plus courantes de la grossesse (Coulam, 1992) avec une incidence de 0.3% (Hill, 1993). De plus, l'obtention d'une grossesse viable à terme est le résultat de procédés hautement sélectifs puisque 10 à 20% de toutes les conceptions se terminent par un avortement spontané détecté (Hill, 1990).

Le phénomène d'avortements à répétition (AR) se définit comme étant l'arrêt spontané de trois (3) grossesses consécutives avant la vingtième semaine de gestation. Il y a 2 principaux types d'AR: les AR primaires, qui surviennent chez une femme qui n'a jamais eu une grossesse à terme, et secondaires, qui surviennent chez une femme qui a préalablement mis un ou plusieurs enfants au monde.

Près de 90% des avortements spontanés détectés se produisent au cours du premier trimestre. Il est souvent très difficile d'en connaître l'étiologie. Dans certains cas, l'étiologie est identifiable et le Tableau V rassemble les causes les plus fréquentes. La cause la plus commune est d'ordre génétique, soit une anomalie chromosomique foetale qui est rencontrée dans 40 à 50% des cas (Winston, 1993; Carr, 1972). Elle consiste en une distribution anormale des chromosomes qui survient lors de la première et de la seconde division méiotique de l'ovogenèse ou de la spermatogenèse, ou encore lors de la mitose. Le défaut chromosomique le plus courant est la trisomie autosomiale (50 à 60%) suivie de l'anaploïdie (15 à 25%) et, finalement, la polyploïdie (15 à 20%). L'âge avancé des parents pourrait avoir une incidence sur les défauts chromosomiques (Warburton, 1964; Rodrigo, 1975), ainsi que le caryotype parental. La deuxième cause d'AR est l'anomalie utérine rencontrée dans 10 à 15% des cas (Stray-Dederson, 1984) et principalement constituée de fibromes et de polypes. Mais il y a également les défauts congénitaux produits lors de la fusion du canal de Müller: l'utérus avec un septum ou en "T", ce dernier pouvant survenir suite à une exposition utérine au diethylstilbestrol (DES) (Kaufman, 1980). L'incompétence cervicale serait responsable de 8 à 15% des AR. Une cause endocrinienne, comme un taux élevé de LH peut conduire à une embryogenèse anormale et mener à un avortement spontané. De plus, des infections impliquant le toxoplasma, l'ureaplasma, le listeria, le brucella, le chlamydia et l'herpès simplex ont toute été associées à des avortements, ces dernières pouvant interférer au niveau de l'organogenèse. Mais une relation directe de cause à effet entre l'infection et l'AR n'est pas très claire (Munday, 1984). Certains auteurs suggèrent que l'endométriose pourrait avoir un effet sur les AR (Naples, 1981; Radawanska, 1981). Toutefois, jusqu'à présent la plupart des

TABLEAU V

ÉTIOLOGIE DES AVORTEMENTS A RÉPÉTITION

ORIGINE	PROPORTION
Aberration chromosomique	40 à 50%
Trisomie autosomiale	
Anaploïdie	
Polyploïdie	
Anomalie utérine	10 à 15%
Septum utérin	
Fibromyome	
Incompétence cervicale	8 à 15%
Idiopathique	40 à 50%

Adapté de: "Infertility" par Winston (1993)

études ne démontrent aucun lien entre l'endométriose et l'avortement spontané (Pittaway, 1986). Par conséquent, le fait demeure que dans 40 à 50% des cas, l'étiologie des AR n'est pas identifiée.

1.2.1 Facteurs immunologiques

Récemment, des perturbations immunologiques ont été associées aux AR. Les évidences s'accumulent à cet effet (Van Iddekinge, 1993). La grossesse mammalienne est associée à une induction et à une adaptation des réactions immunologiques maternelles. En effet, le rôle du système immunitaire étant de protéger l'individu contre des antigènes du non-soi, il n'est donc pas surprenant d'observer une réponse immunitaire maternelle contre le fœtus. Selon Hill (1993), jusqu'à 90% des avortements idiopathiques pourraient avoir une étiologie immunologique. De plus, McIntyre, en 1989, a suggéré qu'une réponse allogénique anormale pourrait être à l'origine des AR chez plusieurs des couples souffrant d'infertilité idiopathique. De façon parallèle, des études récentes ont démontré que l'incidence des AR augmente chez les patientes souffrant de lupus érythémateux systémique (Maier, 1989).

La protection du fœtus contre le rejet par le système immunitaire maternel est attribuée à des mécanismes encore mal élucidés. Certaines des hypothèses avancées incluent l'élaboration d'anticorps bloquants circulants, de cellules ou de facteurs locaux suppresseurs et d'anticorps leucocytotoxiques (Scott, 1987).

Le système immunitaire est divisé en deux parties: l'une dite humorale, médiée par des anticorps sécrétés par les cellules plasmiques (lymphocytes B activés) et l'autre, dite cellulaire, médiée par les macrophages, les cellules NK, les lymphocytes T et leurs produits solubles (cytokines). Certains mécanismes immunologiques potentiellement impliqués dans les avortements spontanés à répétition ont été mis en évidence, ils affectent l'immunité humorale ou cellulaire.

1.2.1.1 Causes humorales

L'incidence des avortements spontanés semble augmenter chez les femmes atteintes de maladies auto-immunes. Les anticorps anti-phospholipides que l'on retrouve dans le syndrome de l'anticoagulant lupique, sont des immunoglobulines (Ig) de type G ou M affectant le complexe activateur de la prothrombine (cascade de la coagulation) en se liant à la portion phospholipidique du complexe (Thiagaragian, 1980). Les anticorps antiphospholipides ont la propriété de se fixer sur tous les phospholipides chargés négativement. Cependant, les mécanismes expliquant les pertes foetales répétées en présence d'auto-anticorps demeurent inexpliqués. Dewolf a proposé, en 1982, que ces anticorps induiraient une thrombose des vaisseaux du placenta, entraînant une insuffisance placentaire. Plus précisément, les anticorps anti-phospholipides, se liant aux phospholipides membranaires des cellules endothéliales, pourraient bloquer la relâche des acides arachidoniques, et ainsi diminuer la production de prostacycline et augmenter celle de thromboxane. Le rôle néfaste potentiel de tels anticorps est encore controversé puisque les évidences d'une thrombose des vaisseaux placentaires n'est pas retrouvée de façon constante chez le fœtus avorté de femmes avec anticorps anti-

phospholipides. Malgré tout, plusieurs études affirment que ces anticorps ont un effet négatif sur la grossesse (Branch, 1989; Doherty, 1992, Christiansen, 1992).

On croyait que les anticorps antispermatozoïdes pouvaient interférer uniquement lors d'événements pré-fécondation. Mais il a été démontré que des antigènes spermatiques sont présents sur l'ovule fécondé et le jeune embryon (Hill, 1993). Ainsi, les anticorps antispermatozoïdes pourraient jouer un rôle de médiateur dans les avortements spontanés à répétition (Menze, 1970). De plus, des expériences animales ont démontré que le transfert passif d'anticorps contre les spermatozoïdes résulte en un avortement spontané (Hill, 1993).

L'hypothèse selon laquelle la carence d'un agent bloquant (anticorps) dans le sérum maternel pourrait causer des AR est basée sur trois prémisses: 1) il y a une réponse immunologique maternelle anti-foetus lors de toutes grossesses, et cette dernière se doit d'être bloquée; 2) il y a des anticorps bloquants produits dans toutes les grossesses réussies, qui préviennent la réaction maternelle anti-foetus (Rocklin, 1976); 3) en absence d'anticorps bloquants, il y a un avortement du foetus (Sargent, 1988). Il semble que le fait d'avoir des haplotypes HLA communs chez les parents causerait une déficience en agents bloquants et entraînerait des avortements répétitifs (Beer, 1988). Cependant, ce phénomène est controversé puisqu'une grossesse normale peut être observée chez la femme et la souris déficientes en lymphocytes B et agammaglobulinémiques (Rodger, 1985).

1.2.1.2 Causes cellulaires

Une déficience de cellules T suppressives (Ts) dans le décidua de souris a été démontré précédemment à un avortement spontané (Clark, 1986). Des travaux chez l'humain supportent l'implication de telles cellules dans l'AR. En effet, une déficience en cellules suppressives déciduales est constatée chez les femmes après une grossesse chimique suite à une FIV-ET (Nabel, 1984). De plus, les decidua normales humaines contiennent des cellules suppressives et des facteurs supprimeurs similaires à ceux retrouvés chez la souris (Clark, 1988; Daya, 1987). Il a été démontré que les fonctions et l'activation des macrophages qui sont normalement supprimés lors de la grossesse, ne le sont plus lors d'avortements spontanés (Hill, 1989). Par contre, aucun facteur responsable du recrutement des cellules suppressives n'a encore été identifié.

Les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ne sont pas exprimés normalement sur le trophoblaste humain à l'exception d'une forme atypique de classe I, appelée HLA-G que l'on retrouve sur le syncytiotrophoblaste (Kovats, 1990). De plus, Anderson en 1988, a démontré que l'expression de cet antigène du CMH peut être induite sur le trophoblaste par l'interferon- γ (IFN- γ). Plusieurs études ont démontré la présence de monocytes et de lymphocytes T dans l'endomètre humain normal. Ainsi, lorsque ces cellules sont activées et sécrètent de l'IFN- γ (dû soit à une allo-immunité ou à une infection), l'expression des antigènes du CMH serait induite sur le trophoblaste. Suite à l'induction de ces antigènes trophoblastiques, une attaque des T cytotoxiques peut être débutée (Berkowitz, 1988; Arp, 1990). Un mécanisme potentiel d'AR d'étiologie immunologique pourrait impliquer la sécrétion locale d'IFN- γ produite par les lymphocytes T activés et les

macrophages situés dans le tractus génital féminin en réponse à une infection ou à une allo-immunité (Hill, 1992; Chavez, 1984; Oksenberg, 1986; Zigril, 1991).

L'hypothèse selon laquelle des produits solubles des cellules immunitaires activées (cytokines) pourraient compromettre la grossesse se nomme "immunodystrophisme". Il y a plusieurs évidences qui indiquent que certains produits immunologiques auraient un effet toxique sur le tissu foeto-placentaire (Anderson, 1988). Les cytokines IFN- γ et TNF- α peuvent inhiber différents processus de la reproduction (Hill, 1987; Haimovici, 1992; Berkowitz, 1988). Comme l'endomètre et la decidua sont des tissus immunologiquement dynamiques (Hill, 1990), une activation du système immunitaire local et une production de cytokines en haute concentration peuvent se produire en réponse aux antigènes étrangers exprimés sur le trophoblaste (Hill, 1988) ou encore, suite à une infection, et ainsi mettre un terme à la grossesse.

Certains médiateurs du système immunitaire pourraient être indispensables au succès d'une grossesse. En effet, plusieurs études ont démontré, chez différentes espèces, la présence de "Colony stimulating factor-1" (CSF-1) et de "transforming growth factor" (TGF- β) dans les cultures in vitro d'embryons. L'absence de CSF-1 aurait un effet destructeur sur l'embryon et conduirait à un avortement spontané (Hill, 1993). De plus, l'absence de TGF- β , qui est un puissant immunosuppresseur, provoquerait un rejet du fœtus par la mère. Ces deux théories restent cependant encore sujet à caution, n'ayant pas été l'objet d'études approfondies chez l'humain.

1.3 L'ENDOMÉTRIOSE

L'endométriose est une condition pathologique fréquemment rencontrée chez les femmes en âge de procréer, avec une prévalence d'environ 7% chez la population féminine en général (Garzetti, 1993). Cette maladie se caractérise par l'implantation et la prolifération de cellules endométriales autologues ectopiques (Sampson, 1927).

Sampson (1927) décrit l'endométriose comme étant la présence de tissu ectopique possédant les structures histologiques et les fonctions de la muqueuse utérine. Depuis ce temps, quatre théories ont principalement été avancées: implantation, métaplasie coelomique, métastase ou la combinaison du transport et du développement *in situ*. 1) Implantation: c'est-à-dire via des menstruations rétrogrades, le tissu endométrial pourrait remonter les trompes et se retrouver dans la cavité péritonéale et s'implanter (Sampson, 1927). Il a été démontré par Jenkins que les cellules endométriales sont viables et peuvent s'implanter dans la cavité péritonéale chez l'humain (Jenkins, 1986). De plus, certains auteurs rapportent qu'il pourrait même y avoir un transport iatrogénique. C'est-à-dire une dissémination directe du tissu endométrial suite à une chirurgie (Greenhill, 1942). 2) Métaplasie coelomique: La théorie des métaplasies coelomiques est basée sur le potentiel de certaines cellules à, sous certains stimuli, changer leurs caractères et leurs fonctions physiologiques. Cette théorie est peu à peu délaissée puisque selon cette dernière, la membrane coelomique serait à l'origine de cette pathologie, on devrait donc en retrouver chez l'homme également, ce qui est excessivement rare. Une autre possibilité serait qu'il reste des cellules d'origine paramésoneuriques (Müllerian) à certains endroits du corps. Suite à une stimulation hormonale, ces cellules pourraient s'activer et

TABLEAU VI

THÉORIES PROPOSÉES SUR LA PATHOGENESE DE L'ENDOMÉTRIOSE

Implantation	
menstruation rétrograde	Sampson, 1921
mécanique, iatrogénique	Greenhill, 1942
menstruation rétrograde + LUF	Brosens, 1978
menstruation rétrograde + immunodéficience	Dmowski, 1981
Métastase	
croissance continue + étalement	Cullen, 1908
transport via système vasculaire	Halban, 1924
transport via système lymphatique	Sampson, 1925
Métaplasie	
épithélium germinale de l'ovaire	Waldeyer, 1870
résidu paramésométrique	Russel, 1899
métaplasie coelomique	Meyer, 1919
stimulation hormonale	Novak, 1931
induction par substances spécifiques	Merril, 1963
pronephron embryonique	von Recklinghausen, 1898
Combinaison de plusieurs théories	

former de l'endomètre (Russell, 1899). Mais, selon cette théorie, l'endométriose devrait s'activer dès la ménarche ce qui n'est pas le cas. 3) Métastase: L'endométriose a un caractère métaplasique de par sa croissance continue et son étalement dans tout l'organisme. En effet, d'autres auteurs évoquent le transport lymphatique et vasculaire comme responsable de l'endométriose que l'on retrouve dans les sites profonds et éloignés du péritoine. 4) Combinaison du transport et du développement *in situ*: théorie proposée par Javert (1951), et qui regroupe la capacité de régénération de l'endomètre et le système vasculaire pour expliquer les déplacements endométriaux. On a longtemps cru que le phénomène des menstruations rétrogrades était la cause de cette pathologie. Mais, Halme, en 1984, a rapporté que plus de 90% des femmes menstruées présentaient de telles menstruations. Or, seulement une faible proportion d'entre elles vont développer de l'endométriose. Nous devons donc concevoir des mécanismes additionnels favorisant la persistance de ces cellules dans des sites ectopiques (Tableau VI). Plusieurs évidences, jusqu'à présent, soulèvent la possibilité d'un déficit immunologique pour expliquer cette pathologie (Hill, 1992; Oosterlynck, 1991; Steele, 1984; Dmowski, 1981). Plusieurs revues rétrospectives suggèrent une prédisposition familiale à l'endométriose. De plus, Simpson, en 1980, a démontré qu'une transmission polygénique/multifactorielle semble exister. Selon son étude, il y aurait une augmentation de 7% du risque de développer de l'endométriose chez un parent de premier degré lorsque comparé à l'incidence dans la population générale.

1.3.1 Classification de l'endométriose

Les sites les plus fréquents d'endométriose sont les ligaments utérins (rond, utérosacré), les ovaires, le péritoine pelvien et le septum rectovaginal. Un premier système de classification de l'endométriose a été proposé par Acosta en 1973. Cette classification tient compte de l'endroit de l'implantation, de sa grosseur, sa profondeur, sa couleur et s'il contient un liquide chocolaté. De plus, une grille d'évaluation de l'endométriose a été produite par "The American Fertility Society" (1985) pour faciliter le diagnostic et la gradation de la sévérité suite à l'évaluation laparoscopique (Figure 2). Un diagnostic définitif de l'endométriose peut parfois nécessiter une évaluation microscopique pour identifier clairement les glandes et le stroma dans l'implant endométriotique prélevé. La difficulté du diagnostic s'accroît à cause de l'existence d'une forme d'endométriose microscopique, impossible à déceler à partir d'un simple examen visuel. Ainsi, seule une biopsie du péritoine, qui semble sain, avec l'examen microscopique pourra révéler la présence d'endométriose (Murphy, 1986).

1.3.2 Méthode de diagnostic de l'endométriose

Jusqu'à présent, la meilleure façon de poser un diagnostic d'endométriose demeure de procéder à une laparoscopie diagnostique sous anesthésie générale. Depuis quelques années, différents chercheurs tentent de mettre au point une méthode de détection qui permettrait d'éviter dans certain cas une intervention chirurgicale. Les radiographies, ultrasonographies et tomographies assistées n'ont aucune utilité dans le diagnostic de l'endométriose. L'imagerie

par résonance magnétique (MRI) serait capable de détecter des lésions endométriotiques

Figure 2

Grille d'évaluation de l'endométriose

L'American Fertility Society a produit une grille d'évaluation de l'endométriose pour faciliter le diagnostic et la gradation de la sévérité suite à la laparoscopie.

THE AMERICAN FERTILITY SOCIETY
REVISED CLASSIFICATION OF ENDOMETRIOSIS

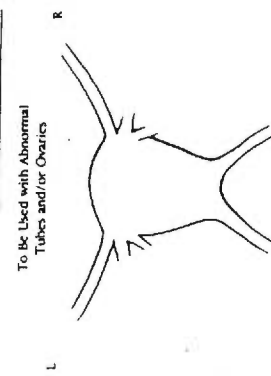
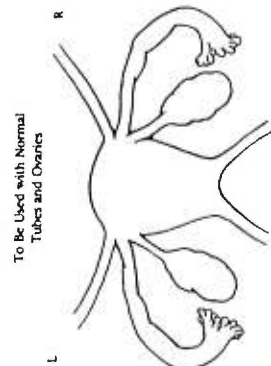


Patient's Name _____ Date _____																																					
Stage I (Minimal) - 1-5	Laparoscopy _____ Laparotomy _____ Photographs _____																																				
Stage II (Mild) - 6-15	Recommended Treatment _____																																				
Stage III (Moderate) - 16-40	Prognosis _____																																				
Stage IV (Severe) - > 40	Total _____																																				
<table border="1"> <tr> <th>ENDOMETRIOSIS</th> <th>< 1cm</th> <th>1-3cm</th> <th>> 3cm</th> </tr> <tr> <td>PERITONEUM</td> <td>Superficial 1</td> <td>2</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Deep 2</td> <td>4</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>R OVARY</td> <td>Superficial 1</td> <td>2</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Deep 4</td> <td>16</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>L OVARY</td> <td>Superficial 1</td> <td>2</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Deep 4</td> <td>16</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>POSTERIOR CULDESAC OBLITERATION</td> <td>Partial 4</td> <td>Complete 40</td> <td></td> </tr> </table>		ENDOMETRIOSIS	< 1cm	1-3cm	> 3cm	PERITONEUM	Superficial 1	2	4		Deep 2	4	6	R OVARY	Superficial 1	2	4		Deep 4	16	20	L OVARY	Superficial 1	2	4		Deep 4	16	20	POSTERIOR CULDESAC OBLITERATION	Partial 4	Complete 40					
ENDOMETRIOSIS	< 1cm	1-3cm	> 3cm																																		
PERITONEUM	Superficial 1	2	4																																		
	Deep 2	4	6																																		
R OVARY	Superficial 1	2	4																																		
	Deep 4	16	20																																		
L OVARY	Superficial 1	2	4																																		
	Deep 4	16	20																																		
POSTERIOR CULDESAC OBLITERATION	Partial 4	Complete 40																																			
<table border="1"> <tr> <th>ADHESIONS</th> <th>< 1/3 Enclosure</th> <th>1/3-2/3 Enclosure</th> <th>> 2/3 Enclosure</th> </tr> <tr> <td>OVARY</td> <td>R Filmy 1</td> <td>2</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Dense 4</td> <td>8</td> <td>16</td> </tr> <tr> <td></td> <td>L Filmy 1</td> <td>2</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Dense 4</td> <td>8</td> <td>16</td> </tr> <tr> <td>TUBE</td> <td>R Filmy 1</td> <td>2</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Dense 4</td> <td>8</td> <td>16</td> </tr> <tr> <td></td> <td>L Filmy 1</td> <td>2</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Dense 4</td> <td>8</td> <td>16</td> </tr> </table>		ADHESIONS	< 1/3 Enclosure	1/3-2/3 Enclosure	> 2/3 Enclosure	OVARY	R Filmy 1	2	4		Dense 4	8	16		L Filmy 1	2	4		Dense 4	8	16	TUBE	R Filmy 1	2	4		Dense 4	8	16		L Filmy 1	2	4		Dense 4	8	16
ADHESIONS	< 1/3 Enclosure	1/3-2/3 Enclosure	> 2/3 Enclosure																																		
OVARY	R Filmy 1	2	4																																		
	Dense 4	8	16																																		
	L Filmy 1	2	4																																		
	Dense 4	8	16																																		
TUBE	R Filmy 1	2	4																																		
	Dense 4	8	16																																		
	L Filmy 1	2	4																																		
	Dense 4	8	16																																		

If the fimbriated end of the fallopian tube is completely enclosed, change the point assignment to 16.

Additional Endometriosis: _____

Associated Pathology: _____



EXAMPLES & GUIDELINES

STAGE I (MINIMAL)

PERITONEUM Superficial Endo - 1-3cm - 2
R OVARY Superficial Endo - < 1cm - 1
Filmy Adhesions - < 1/3 - 4
TOTAL POINTS - 7

STAGE II (MILD)

PERITONEUM Deep Endo - > 3cm - 6
R OVARY Superficial Endo - < 1cm - 1
Filmy Adhesions - < 1/3 - 1
L OVARY Superficial Endo - < 1cm - 1
TOTAL POINTS - 9

STAGE III (MODERATE)

PERITONEUM Deep Endo - > 3cm - 6
CULDESAC Partial Obliteration
L OVARY Deep Endo - 1-3cm - 16
TOTAL POINTS - 26

STAGE III (MODERATE)

PERITONEUM Superficial Endo - > 3cm - 4
R TUBE Filmy Adhesions - < 1/3 - 1
R OVARY Filmy Adhesions - < 1/3 - 1
L TUBE Dense Adhesions - < 1/3 - 16
L OVARY Deep Endo - < 1cm - 4
Dense Adhesions - < 1/3 - 4
TOTAL POINTS - 30

STAGE IV (SEVERE)

PERITONEUM Superficial Endo - > 3cm - 4
L OVARY Complete Obliteration - 40
R OVARY Deep Endo - 1-3cm - 16
Dense Adhesions - < 1/3 - 8
L TUBE Dense Adhesions - < 1/3 - 8
L OVARY Deep Endo - 1-3cm - 16
Dense Adhesions - > 2/3 - 16
L TUBE Deep Endo - 1-3cm - 16
Dense Adhesions - > 2/3 - 16
TOTAL POINTS - 114

Determination of the stage or degree of endometrial involvement is based on a weighted point system. Distribution of points has been arbitrarily determined and may require further revision or refinement as knowledge of the disease increases.

To ensure complete evaluation, inspection of the pelvis in a clockwise or counterclockwise fashion is encouraged. Number, size and location of endometrial implants, plaques, endometriomas and/or adhesions are noted. For example, five separate 0.5cm superficial implants on the peritoneum (2.5 cm total) would be assigned 2 points. (The surface of the uterus should be considered peritoneum. The cervix, fallopian tubes and/or ovaries should be assigned the highest score only for peritoneum, ovary, tube or culdesac. For example, a 4cm superficial and a 2cm deep implant of the peritoneum should be given a score of 6 (not 8). A 4cm

deep endometrioma of the ovary associated with more than 5cm of superficial disease should be scored 20 (not 24). 16 points are assigned to the remaining tube and ovary should be multiplied by two. ** Points assigned may be circled and totaled. Age: gain of points indicates stage of disease (minimal, mild, moderate, or severe).

The presence of endometriosis of the bowel, urinary tract, fallopian tube, vagina, cervix, skin etc., should be documented under "additional endometriosis." Other pathology such as tubal occlusion, leiomyomas, uterine fibroids, etc., should be noted. Endometriosis should be depicted as specifically as possible on the sketch of pelvic organs, and means of observation (laparoscopy or laparotomy) should be noted.

pendant son niveau d'efficacité est faible (Arrive, 1989, Zawin, 1989). L'endométriose présente certaines caractéristiques néoplasiques: elle est insidieuse et envahissante dans sa façon de se répandre, de se terminer en fibrose, et de laisser des cicatrices sur n'importe quelle structure pelvienne. De ce fait, certains auteurs ont tenté de mettre au point une nouvelle méthode de détection de l'endométriose, mesurant l'antigène CA125. Le OC125 est un anticorps monoclonal qui reconnaît l'antigène CA125 présent sur l'épithélium coelomique. Son dosage permet de détecter l'antigène circulant dans le sang périphérique (Barbieri, 1986). De toute évidence, ce test n'est pas particulièrement spécifique, puisque dans la plupart des cancers ovariens épithéliaux, on retrouve un taux élevé de CA125. De plus, lors des menstruations, le CA125 demeure élevé chez les femmes avec ou sans endométriose (Masahashi, 1988).

Des anticorps anti-endomètre ont aussi été retrouvés dans le liquide péritonéal de patientes avec endométriose. Weed et Aquenberg (1980) ont été les premiers à proposer que ces anticorps se soient développés suite à l'interaction entre l'endomètre ectopique et les cellules du système immunitaire présent dans le liquide péritonéal. De plus, lors d'études subséquentes, il a été démontré par différentes techniques: immunodiffusion (Badawy, 1984), hémagglutination passive (Chihal, 1986), immunohistochimie (Kennedy, 1990a), ELISA (Kennedy, 1990b) et western blot (Mathur, 1990), que des anticorps anti-endomètre pouvaient également être détectés dans le sérum. Bien qu'aucune corrélation entre le taux d'anticorps et la sévérité de la maladie n'a pu être établie, la plupart des études ont démontré un taux supérieur d'anticorps chez les patientes souffrant d'endométriose que chez les femmes contrôles (Badawy, 1984; Mathur, 1990; Fernandez-Shaw, 1993). L'évaluation des anticorps

anti-endomètre comme outil pour diagnostiquer l'endométriose est un meilleur marqueur que le dosage du CA-125, avec une sensibilité variant de 0.74 à 0.85 et une spécificité variant de 0.67 à 1.00. Par contre, dû à la variabilité des résultats, l'utilisation des anticorps anti-endomètre comme test valable pour le dépistage de l'endométriose n'est pas souhaitable.

Certains auteurs proposent que le développement de l'endométriose serait attribuable à des anomalies des cellules endométriales eutopiques ou intra-utérines. De ce fait, l'équipe de Wingfield (1995) a tenté d'utiliser un index de prolifération des cellules endométriales basé sur une méthode immunohistochimique pour le diagnostic de l'endométriose. Cette technique offre une très grande spécificité, au-delà de 96%. Par contre, sa faible sensibilité (40%) a limité son utilisation diagnostique.

D'autres marqueurs pour l'évaluation de l'endométriose sont présentement à l'étude. Par exemple, certaines études ont identifié un taux élevé de protéine placentaire 14 (PP14) et du propeptide aminoterminal du procollagène de type III (PIIINP) dans le sérum et le liquide péritonéal de patientes souffrant d'endométriose (Telimaa, 1989; Spuijbroek, 1992). Jusqu'à présent, l'évaluation de ces deux protéines démontre un manque de spécificité et de sensibilité.

1.3.3 L'infertilité associée à l'endométriose

Certaines études ont démontré que jusqu'à 30 à 40% des patientes qui souffrent d'endométriose sont également infertiles. Au cours des stades sévères de la maladie, il est

facile de comprendre que des altérations mécaniques provoquées par cette maladie interfèrent avec la fécondité. Il apparaît toutefois que l'infertilité est également associée à l'endométriose lors de stades précoces (stade I et II). Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont tenté d'expliquer comment l'endométriose minime et légère peut causer l'infertilité (*in vivo*: Hill, 1988; Tummon, 1988; *in vitro*: Suginami, 1986). Ainsi, il est possible que les implants endométriotiques sécrètent des prostaglandines qui perturbent la mobilité, ou causent des dysfonctions tubaires (Muse, 1982). De plus, les macrophages attirés par ces implants ectopiques produiraient une plus grande quantité de prostaglandines et causeraient un processus inflammatoire péritonéal activant la réponse immunitaire (Badawy, 1984). Cette réponse immunitaire pourrait interférer au niveau de l'implantation embryonnaire et/ou compromettre le transport des gamètes dans la cavité utéro-tubaire.

Suginami a identifié la présence d'un inhibiteur de capture ovocytaire (OCI) dans le liquide péritonéal de femmes avec endométriose (Suginami, 1986). Cette macromolécule interfère dans la capture de l'ovocyte par les fimbriae tubaires en formant une fine membrane au niveau des fimbriae. Ce processus étant réversible, lorsque cette molécule est éliminée, les fimbriae récupèrent leur fonction normale (Suginami, 1988). La macromolécule forme une fine membrane au niveau des fimbriae. Malheureusement, les thérapies médicales ou chirurgicales utilisées jusqu'à maintenant pour le traitement de l'endométriose se sont avérées inefficaces pour les femmes qui veulent conserver leur capacité reproductive. En effet, plusieurs études ont comparé le taux de grossesses, suite à différents traitements médicaux ou chirurgicaux conservateurs, par rapport à aucun traitement et aucune différence significative n'a été identifiée (Evers, 1989; Hull, 1987; Bayer, 1988). Ces résultats suggèrent 2 hypothèses: 1)

que la présence d'endométriose minime ou légère n'est aucunement impliquée en infertilité; ou 2) que les traitements présentement utilisés sont inefficaces.

Actuellement, le lien de cause à effet entre l'infertilité et l'endométriose de stade minime ne peut être uniquement attribué à des phénomènes mécaniques et les autres mécanismes postulés ont été investigués de façon incomplète d'où la nécessité d'effectuer des études plus approfondies dans ce domaine.

1.3.4 Endométriose: dysfonction immunologique

Plusieurs caractéristiques auto-immunes sont présentes dans cette maladie, à savoir une prépondérance chez la femme, une incidence familiale accrue, des dommages tissulaires, l'implication de plusieurs organes, l'augmentation du taux d'immunoglobulines, ainsi qu'une production élevée d'auto-anticorps.

Jusqu'à présent, plusieurs phénomènes immunologiques ont été impliqués dans la pathogenèse de l'endométriose. Vigano, en 1991, et Oosterlynck en 1991, ont démontré que chez les patientes avec endométriose, on observe une diminution significative de la cytotoxicité des cellules NK périphériques contre des antigènes endométriaux autologues. De plus, cette diminution de l'activité des cellules NK périphériques semble être en corrélation avec la sévérité de la maladie (Oosterlynck, 1991). Certains auteurs ont également observé une résistance des cellules endométriales (utérines) de patientes souffrant d'endométriose

présentant une résistance à la lyse par les cellules NK de femmes sans endométriose (Iwasaki, 1993; Oosterlynck, 1991). Il semble donc y avoir deux phénomènes différents impliqués dans la pathogenèse de l'endométriose. Des dysfonctions immunologiques au niveau du péritoine ont également été démontrées, telle qu'une diminution de l'activité cytotoxique des cellules NK; cette diminution est 2 à 3 fois supérieure à celle observée au niveau sanguin. Également, le nombre de macrophages péritonéaux et leur niveau d'activation était augmenté. De plus, une augmentation des lymphocytes T suppresseurs et une diminution des lymphocytes T cytotoxiques ont été observées dans le liquide péritonéal de ces patientes comme dans la circulation sanguine. Une relation inversement proportionnelle semble exister entre la diminution de l'activité des cellules NK tant dans le sang que dans le péritoine et la gravité de la maladie (Oosterlynck, 1992). De plus, la présence de cellules CD45+, CD3+ et de cellules CD11c a été démontrée dans les implants endométriotiques (Tabibzadeh, 1991). On les retrouve en plus grandes proportions que dans l'endomètre, ce qui indiquerait que la majorité des leucocytes dans les implants seraient des cellules T et des macrophages.

Plusieurs auteurs soulèvent la possibilité d'un phénomène d'immunosuppression dans l'endométriose. Puisque l'augmentation des lymphocytes T suppresseurs et la diminution des lymphocytes T cytotoxiques observées dans le sang et le péritoine des patientes avec endométriose sont deux événements normalement associés à l'immunosuppression. Également, Wang, en 1987, a démontré que le surnageant des cellules endométriales supprime la réponse lymphocytaire. De plus, Tanaka, en 1992, a démontré la présence d'un facteur immunosuppresseur dose-dépendant dans le sérum. Dmowski (1987), affirme que l'immuno-déficience cellulaire identifiée dans l'endométriose pourrait être transmise génétiquement et

dépend de l'altération des molécules d'adhésion. Pour sa part, Garzetti, en 1993, affirme que l'endométriose est une maladie oestrogène-dépendante en démontrant une relation inverse entre la concentration sérique de l'oestrogène et l'activité des cellules NK. Un effet immunosuppresseur des oestrogènes sur les cellules du système immunitaire ayant d'ailleurs déjà été démontré (Ferguson, 1985; Provincial, 1991).

Les altérations immunologiques rencontrées dans l'endométriose semblent donc suggérer un problème systémique, la déficience de l'activité des cellules NK étant retrouvée tant dans la circulation sanguine qu'au niveau du liquide péritonéal. Mais, la déficience fonctionnelle des cellules NK est-elle la cause ou la conséquence de la maladie ? Malgré que ce sujet soit encore controversé, Oosterlynck, en 1992, affirmait que c'est une cause, puisque l'irradiation des lésions endométriotiques ne rétablit pas l'activité des cellules NK. C'est-à-dire que même si les lésions pathologiques sont éliminées, les cellules NK périphériques et péritonéales ne retrouvent toujours pas leur activité cytotoxique.

1.4 L'IMMUNOLOGIE DE LA REPRODUCTION

L'immunologie semble jouer un rôle très important dans la reproduction mammalienne. En effet, pour qu'une grossesse survienne, des modifications de la réponse normale aux antigènes étrangers doivent se produire chez la femelle. Ces modifications peuvent altérer la réponse immunitaire cellulaire ou médiée par les anticorps et peuvent se produire localement ou systématiquement. Cependant, à l'heure actuelle, nous ne connaissons pas toutes les modifications immunologiques impliquées lors de la gestation et encore moins leurs effets. Il

est donc très important de continuer la caractérisation immunologique du tractus génital féminin pour améliorer notre compréhension des mécanismes immunologiques normaux et pathologiques actifs en reproduction.

1.4.1 L'immunologie humorale

Le nombre d'investigations de la présence d'anticorps dans les phénomènes de reproduction a considérablement augmenté au cours des dernières années. Certains auteurs affirment que l'incompatibilité immunologique pourrait être responsable de l'infertilité chez 10% des couples classés dans la catégorie d'infertilité idiopathique (Haas, 1980). Cette affirmation est basée sur la présence d'anticorps dirigés contre les spermatozoïdes dans le sérum ou le mucus de la femme. Une équipe a aussi identifié la présence d'anticorps dirigés contre la zone pellucide (Shivers, 1977).

Les anticorps de type IgA, IgG et IgM font partie de la physiologie normale du tractus génital féminin et ont chacun des propriétés distinctes. Les immunoglobulines de type A peuvent être produites localement dans l'utérus, tandis que les IgG et les IgM proviennent de la circulation sanguine. Les IgA utérins constituent la première ligne de défense contre l'invasion des micro-organismes. Les IgG et IgM sont responsables de l'élimination des spermatozoïdes par les leucocytes (Jones, 1980). On retrouve aussi une quantité importante d'immunoglobulines dans les trompes (Pring, 1979). Nous avons déjà décrit précédemment le rôle des anticorps antispermatozoïdes, anti-phospholipides, anti-endométriaux ainsi que des antigènes HLA dans l'étiopathogénie des avortements à répétition (voir section 1.2). Il est donc clair que l'appareil

reproducteur féminin possède tous les éléments nécessaires pour induire une réponse immunologique humorale. Cependant, alors que ces anticorps sont produits par des lymphocytes B que l'on retrouve dans le système sanguin et lymphatique, la présence de lymphocytes B dans le tractus génital n'a pas été clairement documentée. De même, les sites d'interaction de la réponse immune B demeurent énigmatique.

1.4.2 L'immunologie cellulaire

Depuis plusieurs années, on sait que plusieurs cellules du système immunitaire sont présentes dans l'appareil reproducteur, mais leurs rôles physiologiques et pathophysiologiques ne sont pas complètement élucidés. Par contre, les fonctions immunitaires cervicales sont grandes; les spermatozoïdes sénescents y sont éliminés par les macrophages ou lysés par la cascade du complément. De plus, on retrouve des macrophages oviductaires et l'on croit qu'ils migrent dans les trompes en provenance de la cavité péritonéale (Haney, 1983). Il reste encore beaucoup de connaissances à acquérir au niveau de l'immunologie cellulaire dans le système reproducteur féminin pour arriver à bien comprendre toutes les composantes de la pathophysiologie de l'infertilité.

Le système immunitaire est un réseau interactif très complexe, qui comprend différents types cellulaires et leurs produits de sécrétion respectifs. Dans cette population hétérogène, on retrouve des lymphocytes T et B, des monocytes/macrophages et des cellules NK. Ces cellules ont plusieurs fonctions, comme la présentation d'antigènes ou "processing", la sécrétion d'anticorps, la phagocytose ou encore l'activation d'autres cellules immunitaires qui

sont majoritairement médiées par la sécrétion d'une ou plusieurs cytokines incluant les interleukines et les interférons.

Dans un processus normal, le système immunitaire est activé lors de l'exposition à des antigènes et les fonctions de la réponse immunitaire primaire sont enclenchées, résultant en l'élimination de ces antigènes. L'élimination des antigènes peut être contrôlée par différents mécanismes, impliquant des effecteurs spécifiques: les anticorps et/ou les lymphocytes T spécifiques. Ces antigènes peuvent également être éliminés par des mécanismes non spécifiques, via les cellules NK. Dans l'endométriose, par exemple, on observerait des changements tant au niveau de l'immunité cellulaire qu'humorale. Cependant, jusqu'à présent tous les mécanismes entourant la pathophysiologie de l'endométriose sont loin d'être élucidés. De plus, il est possible que l'endométriose appartienne à la catégorie des maladies auto-immunes. Ce concept est principalement basé sur l'augmentation du taux des immunoglobulines et la haute fréquence des différents auto-anticorps, ce qui suggère une activation polyclonale des lymphocytes B (Gleicher, 1987). Par contre, il est possible que tous ces changements dans l'immunité humorale associée à l'endométriose soient secondaires à une déficience des fonctions immunitaires cellulaires (Oosterlynch, 1991).

1.4.3 Cellules "Natural Killer" (NK)

Les cellules NK représentent 10 à 15% des lymphocytes du sang périphérique et ont la morphologie de "large granular lymphocytes" (LGL) (Timonen, 1980 et 1981). Les cellules

NK possèdent la capacité de lyser une cellule-cible sans sensibilisation préalable et de façon non restreinte par le complexe majeure d'histocompatibilité (CMH) (Lanier, 1986; Ritz, 1988; Trinchieri, 1989). Le tableau VII nous montre les antigènes de surface et les fonctions des cellules NK. Les cellules NK sont impliquées dans différentes activités physiologiques telles que la destruction des cellules tumorales, la résistance aux infections virales et la régulation de l'hématopoïèse (Trinchieri, 1989; Herberman, 1981). Les cellules NK ont été identifiées à différents sites dans le corps humain comme la rate, la moelle osseuse, le foie, les poumons, les intestins, l'endomètre et le liquide folliculaire (Trinchieri, 1989; Reynolds, 1986; Sakagushi, 1985). On utilise principalement deux antigènes de surface de façon extensive comme marqueurs des cellules NK, soit le CD56 (NKH1 ou leu 19) et le CD16 (Fc γ RIII). L'antigène CD56 est exprimé par toutes les cellules capables de cytotoxicité non restreinte par le CMH (Ritz, 1988; Griffin, 1983; Hersend, 1985). C'est un polypeptide glycosylé, de poids moléculaire autour de 175 à 220 kD (Hersend, 1985; Lanier, 1989). Seulement une petite fraction (moins de 5%) des PBL co-exprime CD56 et CD3 et est capable d'une cytotoxicité non restreinte par le CMH (Lanier, 1986B; Schmidt, 1986). La majorité des CD56+ dans le sang co-exprime l'antigène CD16 qui est un récepteur à faible affinité pour la portion Fc des immunoglobulines (Lanier, 1986B; Perussia, 1983b). Seulement 10% des NK sont CD16-, et ces cellules ont une haute densité d'expression du CD56 (Lanier, 1986B; Nagler, 1989; Caligiuri, 1990; Nagler, 1990). Certaines cellules NK expriment l'antigène CD8, mais en densité plus faible que les lymphocytes T (Griffin, 1983; Lanier, 1983).

TABLEAU VII
CARACTÉRISTIQUES DES CELLULES NK

ANTIGÈNE DE SURFACE	PROPORTION
CD2	70-90%
CD3	0%
CD7	80-90%
CD8	30-40%
CD11a	>95%
CD11b	80-90%
CD11c	30-60%
CD15	<5%
CD16	80-90%
CD18	>95%
CD38	60-80%
CD54	30-50%
CD56	>95%
CD57	50-60%
CD58	85-95%
CAPACITÉ FONCTIONNELLE	OUI/NON
ADCC	OUI
Activité cytotoxique spontanée	OUI
dépendante des AC et du CMH	NON
Phagocytose	NON
Mémoire immunologique	NON
Capacité proliférative	OUI

Adapté de: "Biology and clinical relevance of human natural killer cells" par Robertson et Ritz (1990)

1.4.3.1 Activité cytolytique des cellules NK

La cytotoxicité de la cellule NK se manifeste quelques heures après son exposition à des cellules cibles sans pré-immunisation. De plus, elle ne nécessite pas l'expression de peptide par le CMH sur les cellules cibles et son activité ne semble pas impliquer une spécificité clonale (Ritz, 1988; Trinchieri, 1989; Herberman, 1981). Cependant, la sensibilité des cellules à l'élimination par les cellules NK semble inversement reliée à l'expression du CMH chez la cellule-cible (Storkus, 1987; Harel-Bellan, 1986). Si l'antigène du CMH est masqué en utilisant un anticorps monoclonal, on augmente la susceptibilité de la cellule-cible à être détruite par les cellules NK (Lobo, 1989). Il a été suggéré que le CMH pourrait inhiber la reconnaissance d'autres molécules de surface par la cellule NK, ou pourrait interagir directement avec les structures de surface de la cellule NK et transmettre un signal négatif pour la cytolyse (Storkus, 1987; Harel-Bellan, 1986). L'activation des cellules NK et leur cytotoxicité seraient ainsi reliées à l'absence de molécule du CMH à la surface des cellules cibles. Les cellules NK possèdent deux systèmes de destruction des cellules-cibles: 1) le système ADCC, qui veut dire cytotoxicité dépendante des anticorps, 2) activité cytolytique spontanée (Robertson, 1990B). De plus, la cellule NK a le choix de deux mécanismes de cytolyse, par ses granules cytotoxiques ou par ses cytokines (Dealtry, 1987). L'activité cytolytique spontanée de la cellule NK se fait en trois étapes: premièrement, il y a la formation d'un conjugué entre la cellule effectrice et la cellule-cible, deuxièmement, il y a l'activation du mécanisme cytolytique (triggering) et troisièmement, il y a le mécanisme cytolytique terminal (Robertson, 1990B). Pour quantifier l'activité cytotoxique, on utilise surtout le test de relargage du chrome radioactif (Pross, 1986). Les cellules-cibles le plus

communément utilisées sont les cellules K562, qui est une lignée tumorale sensible à la lyse par les cellules NK (Pross, 1986).

Pour que les cellules NK exercent leur cytotoxicité, ils doivent préalablement former un conjugué avec la cellule-cible, réalisé par l'intermédiaire des molécules d'adhésion (CAM) (Robertson, 1990A). Principalement, ce sont les molécules LFA-1 (CD11a-CD18), CD2 et ICAM-1 (CD54) qui participent à cet événement. Après la formation du conjugué entre les cellules effectrices et la cellule-cible, il y a l'activation du mécanisme cytolytique. L'activation se fait par des messagers chimiques, comme la phosphorylation de la chaîne zeta (Sugita, 1992). De plus, Sugita, en 1992, a démontré que l'antigène CD27 serait très important lors de cette étape.

L'étape finale de la cytolyse est le déchargement des granules cytotoxiques, qui a pour effet de tuer la cellule-cible par lyse osmotique (Schmidt, 1985). Les granules d'exocytose contiennent des perforines, des serines-estérases et des protéoglycans (sulfate de chondroatine). Le déclenchement de la libération du contenu des granules se fait par des signaux de transduction (mobilisation du calcium et/ou production d'AMP-cyclique et autres). La présence des serines-estérases en concentrations suffisantes est importante puisqu'elles sont impliquées dans l'activation de la perforine (Carpenter, 1988). La présence de protéoglycans est également très importante puisqu'ils servent de protection contre l'autolyse des cellules NK (Schmidt, 1985).

1.4.3.2 Cytotoxicité dépendante des anticorps(ADCC)

L'activité ADCC est médiée par l'antigène de surface CD16. C'est un polypeptide, de 50 à 70 kD, hautement glycosilé exprimé chez 80 à 90% des NK, et qui reconnaît la portion Fc des immunoglobulines (Trinchieri, 1989; Perussia, 1983b). Ce récepteur lie les immunoglobulines de type G 1 et 3, avec une faible affinité, et ne lie pas les IgG 2 ou 4 (Huizinga, 1990; Unkeless, 1989). Le CD16 semble être l'unique responsable pour l'activité ADCC de la cellule NK puisque, si on masque le CD16 avec un complexe immunitaire ou un anticorps, on inhibe la cytolyse (Perussia, 1983b; Trinchieri, 1984). L'activation produite via le CD16 potentialise la cellule NK à tuer la cellule-cible recouverte d'anticorps. Les étapes de cytolyse ressemblent au mécanisme précédent et commencent aussi par la formation d'un conjugué entre la molécule LFA-1 et la molécule CD2 des cellules NK avec la molécule ICAM-1 et la molécule LFA-3 (CD58) de la cellule-cible (Ritz, 1989; Schmidt, 1985; Timonen, 1981; Robertson, 1991).

1.5 L'ENDOMÈTRE

Le succès du processus de la reproduction humaine dépend de la synchronisation du développement endométrial avec le cycle ovarien (Noyes, 1950). Le développement endométrial est composé de deux phases: la phase proliférative et la phase sécrétoire qui sont réglées principalement par les hormones stéroïdiennes en circulation. La phase proliférative débute immédiatement après la menstruation et subit l'influence des oestrogènes. On y voit une prolifération intensive des cellules épithéliales et des cellules stromales. À la fin de la phase proliférative, la concentration des récepteurs de progestérone augmente, surtout sur les

cellules glandulaires, et les récepteurs d'oestrogène commencent à diminuer. La phase proliférative se termine au troisième jour post-ovulation (Ferenczy, 1979).

L'endomètre humain est principalement composé de deux structures: les glandes et le stroma. Le stroma contient des cellules hématopoiétiques et des fibroblastes. L'endomètre se divise en couches fonctionnelle qui est éliminé chaque mois et la couche basale, couche germinale d'où provient le renouvellement (Ferenczy, 1976). Le processus est dirigé par le changement du taux d'hormones ovariennes (oestradiol et progestérone) en circulation. L'oestrogène stimule la prolifération à partir du jour 1. Après l'ovulation, le corps jaune produit la progestérone et il y a peu de prolifération mais les glandes subissent des changements morphologiques pour se préparer à l'implantation. Dans les 48 à 72 heures après l'ovulation, l'activité mitotique baisse. Autour des jours 6 et 7 de la phase sécrétoire, l'endomètre est parfaitement préparé pour l'implantation. Les stéroïdes comme l'oestradiol et la progestérone ont un effet paracrine qui pourrait être médié par le "growth factor" (GF) et le "transforming growth factor- α " (TGF- α) (Tabibzadeh, 1989; Nelson, 1992; McLachlan, 1991).

Jusqu'à présent, les composantes stromales de l'endomètre sont beaucoup moins étudiées que l'épithélium. Il a tout de même été démontré que les cellules stromales aussi subissent quelques changements cycliques et qu'elles joueraient un rôle très important dans l'implantation (More, 1974). Les leucocytes forment une portion substantielle du stroma endométrial chez la femme. Ils représentent environ 7% des cellules stromales lors de la phase proliférative et peuvent augmenter jusqu'à 30% au début de la grossesse. Par exemple, les macrophages sont présents dans l'endomètre non gestant et augmentent en nombre au cours de

la grossesse (Bulmer, 1987; Kamat, 1987; Bulmer, 1989). Plusieurs auteurs affirment que les leucocytes y joueraient un rôle très important au niveau physiologique et pathologique.

Comme le tractus génital féminin est en continuité avec l'environnement externe, il est donc exposé aux micro-organismes comme différentes bactéries et virus. Les leucocytes pourraient ainsi contribuer à préserver la stérilité de la cavité utérine (Kamat, 1987). De plus, plusieurs cellules hématopoïétiques démontrent une activité anti-tumorale et pourraient donc être impliquées au niveau de la prévention du développement de cancer endométrial (Herberman, 1981).

Les cellules lymphoïdes présentes sont majoritairement les lymphocytes T et les "large granular lymphocytes" (LGL). Les cellules T ne varient pas beaucoup en nombre au cours du cycle. Par contre, lors de la phase lutéale tardive, le nombre des LGL augmente (Bulmer, 1989; Klentzeris, 1992). Les cellules T sont dispersées dans tout le stroma, mais on en retrouve quelquefois sous forme de petits agrégats. Contrairement aux lymphocytes T du sang périphérique, seulement 25 à 35% des cellules T sont CD4+ (Bulmer, 1989; Klentzeris, 1992). La fonction des cellules T dans l'endomètre humain est toujours inconnue. Les cellules T peuvent sécréter plusieurs cytokines, et certaines sont connues pour leur action sur la croissance du placenta (Wegman, 1988). Les cellules T CD8+ pourraient être des cellules suppressives et avoir une activité immunosuppressive par le biais du CMH de classe I dans l'endomètre et la decidua (Wang, 1987). Mais, les CD8+ pourraient également avoir une fonction de cellules cytotoxiques qui reconnaissent les cellules-cibles par le biais de l'antigène

du CMH de classe I. Jusqu'à présent, le rôle de ce type de cellules n'a pas été mis en évidence dans l'endomètre.

La présence de cellules granulaires dans l'endomètre est connue depuis longtemps. Mais leur identification comme leucocytes est plus récente (Bulmer, 1987). Le phénotype (CD56+ CD16- CD3) ressemble à une population mineure du sang appelée natural killer cells (NK) (Nagler, 1989). La population de cellules granuleuses, soit les NK, est présente dans l'endomètre tout au long du cycle mais augmente de façon drastique lors de la phase lutéale tardive (Bulmer, 1989; Klentzeris, 1992). Ces cellules comme les lymphocytes T sont réparties dans le stroma et, on les retrouve de plus sous forme d'agrégats à la fin de la phase lutéale. Il semblerait que l'augmentation des CD56+ soit due à une prolifération *in situ* et non à un approvisionnement des vaisseaux sanguins (Klentzeris, 1992; Pace, 1989). Le rôle des cellules NK, est toujours inconnu, mais on croit qu'elles auraient une fonction dans l'implantation et le développement placentaire. Certains auteurs suggèrent que les cellules NK pourraient contrôler l'invasion du trophoblaste dans la decidua par leur activité cytotoxique (King, 1991). De plus, les cellules NK exercent une cytotoxicité non restreinte par le CMH qui joueraient un rôle important dans l'immunité anti-virale et anti-tumorale. L'unité foeto-placentaire humaine est susceptible à une grande variété de micro-organismes qui peuvent provenir du vagin ou de la circulation sanguine. Les cellules NK pourraient avoir un rôle de défense de cette unité foeto-placentaire contre les agents infectieux qui autrement pourraient affecter ou détruire le fœtus.

Par contre, les cellules NK peuvent aussi avoir un rôle pathologique au niveau de l'endomètre puisqu'il a été démontré qu'elles sont capables de lyser les cellules du trophoblaste après une activation par l'interleukine 2 (IL-2) (Ferry, 1991; King, 1990). Ce même phénomène a également été identifié chez la souris (Croy, 1991; Linnmeyer, 1991). Ces cellules NK déciduales ont la capacité de produire du TNF- α , du TGF- β et de l'interféron- γ (Christmas, 1990) et la décidua en culture a aussi le potentiel de produire les protéines G-CSF, M-CSF, GM-CSF et du LIF (Saito, 1993).

Par des techniques morphométriques, Li et ses collaborateurs, en 1990, ont démontré une altération morphologique de l'endomètre de patientes infertiles. Ils ont trouvé, par des études immunohistochimiques, une augmentation du nombre de cellules CD4+ et une diminution des cellules CD8+ et CD56+ dans l'endomètre de ces patientes. Le nombre de macrophages, de lymphocytes B et de cellules NK CD16+ était cependant comparable à l'endomètre de sujets contrôles (Klentzeris, 1994). Une modification de la population leucocytaire pourrait causer une interruption du réseau de cytokines essentielles au développement adéquat du placenta. L'endomètre des patientes souffrant d'infertilité inexplicée démontrerait une déficience en protéine de surface VLA-4 (Klentzeris, 1993), une intégrine qui serait impliquée dans l'implantation.

1.5.1 Méthode d'évaluation de l'endomètre

Bien que la présence des leucocytes dans l'endomètre humain non pathologique soit documentée depuis plus de 30 ans (Rahn, 1968), très peu de données sont disponibles

concernant leurs caractéristiques immunologiques. Jusqu'à présent, plusieurs études ont permis de démontrer l'infiltration significative des leucocytes dans un endomètre non gestant normal (Kamat, 1987; Fernandez-Shaw, 1993; Bonatz, 1992; King, 1989; Tabibzadeh, 1991). Par contre, ces études ont toutes été effectuées à l'aide de techniques immunohistochimiques.

Les études immunohistochimiques sont essentielles pour nous donner la distribution des différentes populations cellulaires présentes dans l'endomètre tels que les agrégats lymphocytaires, l'endroit où se trouve l'épithélium basal et fonctionnel, l'identification des LGL intra-épithéliaux, l'apparition de différentes sécrétions de cytokines, facteurs de croissance. Cela a permis de mettre en évidence qu'il existe différents micro-environnements à l'intérieur de la structure de l'endomètre. Par contre, comme les cellules hématopoïétiques endométriales ne représentent qu'une petite proportion des cellules endométriales, l'évaluation des sous-groupes cellulaires devient complexe. De plus, les méthodes immunohistochimiques ne permettent pas une caractérisation immunophénotypique complète et ne permettent pas d'évaluer l'expression concomitante de différents antigènes. Nous avons besoin d'autres méthodes complémentaires pour nous aider à mieux caractériser ces cellules au niveau de l'endomètre.

La cytométrie de flux, qui a été utilisée avec succès pour caractériser les différentes composantes cellulaires de d'autres tissus, incluant la decidua humaine du premier trimestre (Starkey, 1988; Maruyama, 1993) et à terme (Vince, 1990; Norwitz, 1991), s'avère une méthode intéressante pour l'étude de l'endomètre humain (Figure 3). Elle permet non seulement une analyse rapide et précise mais aussi quantitative de plusieurs types cellulaires.

Une technique fiable d'isolement des cellules leucocytaires présentes dans l'endomètre n'était cependant pas disponible. En effet, jusqu'à présent, les diverses techniques utilisées font toutes appel à des traitements enzymatiques. Or nous avons effectué différentes expériences qui nous ont permis de démontrer que la dissociation enzymatique affectait la détection de plusieurs antigènes de surface pertinents à l'étude des cellules hématopoiétiques T, NK et autres. La nécessité de développer une nouvelle technique d'isolation de ces cellules pour ne pas affecter les antigènes de surface devenait donc évidente.

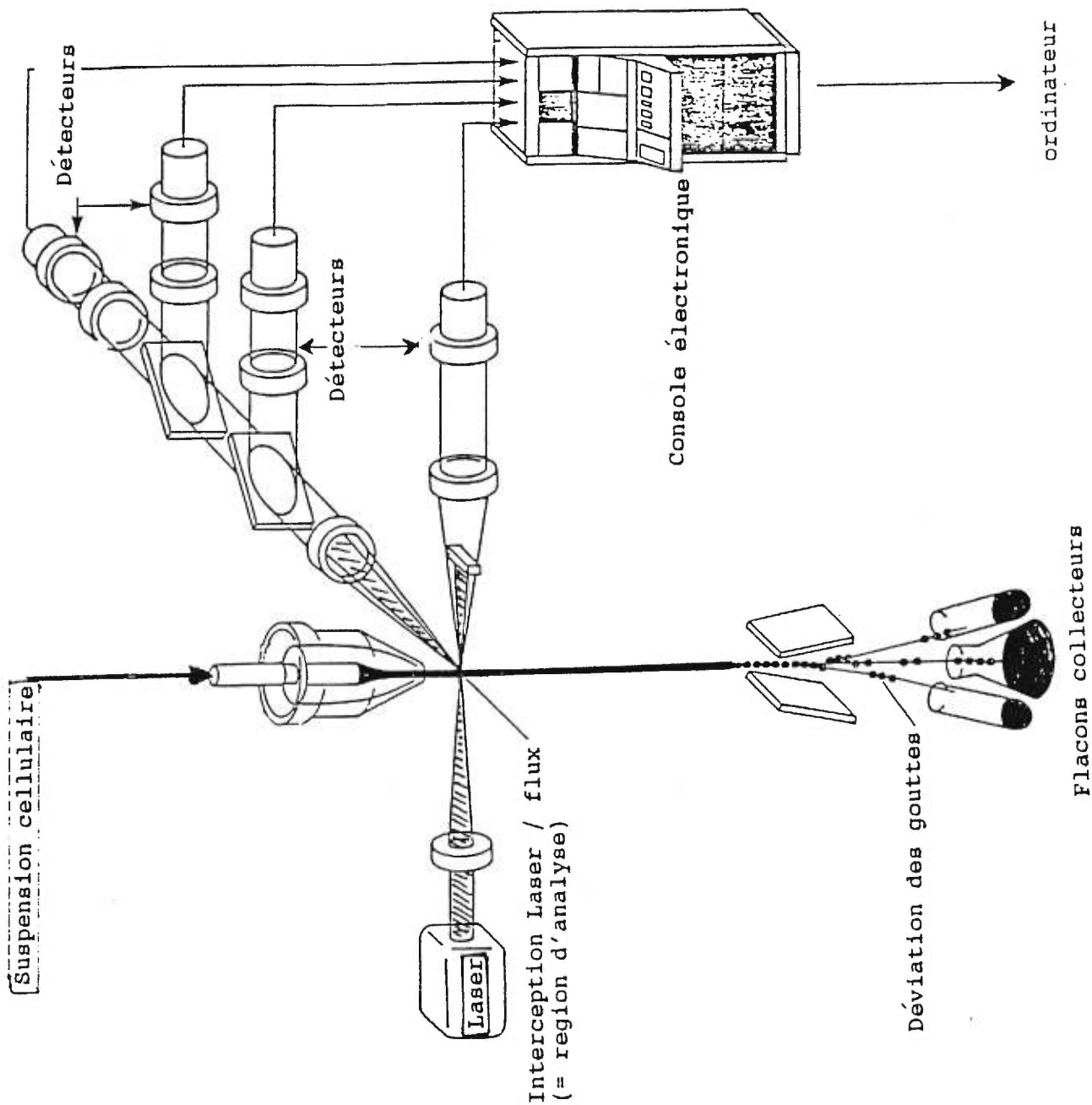
1.6 LIQUIDE FOLLICULAIRE

Le follicule ovarien est composé de 3 structures, la thèque, la granulosa et l'ovule. Les couches cellulaires externes sont appelées "la thèque". La thèque entoure une autre couche cellulaire appelées cellules de la granulosa et qui se définit comme l'ensemble des cellules folliculaires qui entourent l'ovocyte. Elle est riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques. Après la phase sécrétoire, le taux de FSH augmente et stimule la croissance de plusieurs follicules primaires. Lorsque les follicules ont atteint un diamètre de 0.5 cm, ils migrent à la surface de l'ovaire. Un seul follicule dominant va atteindre le diamètre de 1.5 à 2 cm. Suite au pic de LH, l'ovule complète sa première division cellulaire par la formation du premier globule polaire. La croissance folliculaire est accélérée due à l'activité mitotique, et on observe l'accumulation du liquide folliculaire menant à la formation d'une cavité antrale. Le liquide folliculaire est produit principalement par les cellules de la granulosa juste avant l'ovulation (Gosden, 1988).

Figure 3

Cytométrie en flux

Le cytomètre en flux est très utilisé pour la caractérisation des composantes cellulaires. Cette technique débute par le marquage des cellules à l'aide d'anticorps conjugués à des fluorochromes (FITC, PE, RD) spécifiques aux antigènes de surface que nous voulons étudier. Ensuite, la suspension cellulaire marquée est aspirée et véhiculée dans un flot de saline. Les cellules passent une à une devant un laser argon et les signaux fluorescents sont captés par différents détecteurs. L'information est acheminée à la console électronique reliée à l'ordinateur puis est analysée. Cet appareil comporte de multiples avantages: rapidité, quantification, analyse multiparamétrique et surtout possibilité de trier une population cellulaire spécifique.



Un intérêt croissant s'est développé au niveau de la communication entre les systèmes endocrinien et immunitaire, surtout au niveau de l'ovaire. Ce réseau de communication serait bidirectionnel (Wang, 1992). Par exemple, nous savons que l'interleukine-1 peut supprimer le niveau basal de la LH (luteinizing hormone) ainsi que de la FSH (follicule stimulating hormone). Ceci a été mis en évidence chez le rat et le porc (Gottschal, 1987; Fukuoka, 1988). De plus, l'IL-1 aurait un effet inhibiteur de l'activation des récepteurs à LH (Gottshall, 1987; Kasson, 1989). Cependant, peu d'études ont été faites sur les populations leucocytaires et leurs produits de sécrétions tel que les cytokines au niveau de l'ovaire humain. Chez l'humain, l'IL-2 inhiberait de façon significative l'effet inducteur de l'hCG sur la sécrétion de la progestérone (Wang, 1991). Wang, en 1992, a démontré la présence de l'IL-1 et de l'IL-2 dans le liquide folliculaire humain, en concentrations équivalant à la moitié de ce que l'on retrouve au niveau du plasma sanguin.

L'origine des cytokines au niveau du liquide folliculaire demeure toujours indéterminée. Cependant, les macrophages, qui produisent de l'IL-1, ont déjà été identifiés au niveau du liquide folliculaire humain (Loukides, 1990) et au niveau du corps jaune (Lei, 1991). Les lymphocytes T, incluant des lymphocytes T activés qui ont le potentiel de sécréter de l'IL-2, ont aussi été identifiés comme composantes cellulaires du liquide folliculaire humain et du corps jaune (Norman, 1991). L'étude de Wang, en 1992, indique d'ailleurs qu'une corrélation positive semble exister entre le volume du liquide folliculaire et le taux d'IL-2 présent, ce qui indique la possibilité d'une relation mutuelle au niveau du développement et de la maturité du follicule via la concentration d'IL-2. Cependant, il ne semble exister aucune relation entre la

présence des interleukines et le taux d'oestradiol ou de progestérone dans le liquide folliculaire ou encore, dans le plasma sanguin.

D'autres médiateurs du système immunitaire, telles les cytokines, $TNF\alpha$, EGF et IGF-1 ont aussi été identifiés dans le liquide folliculaire humain. On ne retrouve aucune corrélation entre ces cytokines et la stéroïdogénèse (Westergaard, 1989; Norman, 1991).

1.7 BUT DU TRAVAIL

Le but de ce travail était de développer de nouvelles stratégies méthodologiques nous permettant d'approfondir les connaissances sur les différentes populations leucocytaires dans le tractus génital féminin, et d'examiner leur relation physiologique et pronostique selon la catégorie d'infertilité. Dans un premier volet, nous avons mis au point une méthode permettant d'enrichir la fraction leucocytaire endométriale et d'en quantifier les différentes sous-populations par fluoro-cytométrie. Ceci nous a permis de déterminer la quantité des populations leucocytaires présentes dans l'endomètre non gestant de femmes fertiles et de les caractériser immunologiquement. En second lieu, nous avons identifié les populations leucocytaires présentes dans différentes pathologies affectant la fertilité: avortement à répétition, endométriose, facteur tubaire et infertilité inexplicée et évalué leur contribution à la pathophysiologie de ces maladies.

Enfin, nous avons quantifié et caractérisé les populations leucocytaires présentes dans le liquide folliculaire de patientes suivant un programme de fécondation *in vitro* pour déterminer leur contribution à l'infertilité sous-jacente.

2. RÉSULTATS

Les résultats de cette étude ainsi que la description des approches expérimentales utilisées sont présentés dans les quatre manuscrits inclus dans cette thèse. Le premier, intitulé "Flow cytometric characterization of hematopoietic cells in non pregnant human endometrium" a été publié dans la revue American Journal of Reproductive Immunology (vol. 35, pp5-13: 1996). Le second article, intitulé "Endometrial T, B and NK cells in patient with recurrent spontaneous abortion: Altered profile and pregnancy outcome" a été publié dans la revue The Journal of Immunology (vol. 156, pp4027-34: 1996). Le troisième article intitulé "Differential involvement of endometrial lymphocytes in infertile patients with endometriosis" a été soumis à JAMA et, finalement, le quatrième article intitulé "Flow cytometric evaluation of leucocyte subpopulations in the follicular fluids of infertile patients" a été publié dans le journal Fertility & Sterility (vol. 65, pp1135-40: 1996).

En résumé, les résultats présentés dans ces publications sont les suivants:

1. Description d'une méthodologie permettant l'enrichissement des cellules hématopoïétiques endométriales, leur caractérisation et leur classification par cytométrie en flux. De plus, l'évaluation des différentes populations leucocytaires présentes dans l'endomètre non-gestant de femmes fertiles (publication no 1).
2. Identification de certaines modifications des caractéristiques immunophénotypiques des leucocytes endométriaux de femmes non-gestantes avec avortements à répétition idiopathiques. Cette étude a révélé que les patientes avec des avortements habituels ont un déficit des lymphocytes T CD8+ (suppresseurs cytotoxiques) et une augmentation de la proportion de

cellules B dans leur endomètre. De plus, nous avons identifié l'augmentation de la population NK exprimant l'antigène CD16, qui sont potentiellement hautement cytotoxiques. A l'aide de cette étude, nous avons démontré chez ces patientes, l'existence d'une perturbation immunologique précédant l'implantation du fœtus(publication no 2). De plus, le profil immun offre un outil pronostic en permettant l'identification des patientes qui mèneront leur grossesse à terme.

3. Identification de certaines modifications des populations leucocytaires endométriales chez des patientes souffrant d'endométriose et de anomalies tubaires. Cette étude nous a permis de démontrer que les lymphocytes T sont significativement diminués dans l'endomètre de ces patientes. De plus, nous avons observé une augmentation de la population NK et des lymphocytes B. Ces modifications ne sont pas proportionnelles à la sévérité de la maladie. Les patientes avec endométriose peuvent être distinguées des patientes avec facteurs tubaires ainsi que de celles avec infertilité inexplicée selon leur profil immunologique. Cependant, la similitude des résultats obtenus chez les patientes avec facteurs tubaires semble indiquer une association étiopathogénique. Par contre, ces modifications phénotypiques ne sont pas le reflet d'un débalancement immunologique systémique. De plus, cette approche par cytométrie en flux offre un potentiel diagnostique pour l'identification précoce de ces conditions (publication no 3).
4. Description d'une méthodologie permettant la quantification des populations leucocytaires présentes dans le liquide folliculaire. Nous avons pu démontrer à l'aide de cette étude, que les populations leucocytaires ne varient pas au cours de la maturation du follicule. De plus, nous avons démontré que les patientes souffrant d'infertilité idiopathique ont une proportion de lymphocytes T augmentée. Les patientes souffrant d'endométriose ont également une augmentation des populations NK, B et monocytes macrophages dans leur liquide folliculaire (publication no 4).

Flow-Cytometric Characterization of Hematopoietic Cells in Non-Pregnant Human Endometrium

M.-H. LACHAPELLE, P. MIRON, R. HEMMINGS, C. BARON, AND D.C. ROY

Lachapelle M-H, Miron P, Hemmings R, Baron C, Roy DC. Flow-cytometric characterization of hematopoietic cells in non-pregnant human endometrium. Am J Reprod Immunol 1996; 35:5-13 © Munksgaard, Copenhagen

PROBLEM: Immunologic evaluation and quantitation of hematopoietic cells in human endometrium has been difficult to perform, particularly in nonpregnant subjects. In this study, we describe a method for the flow-cytometric characterization of hematopoietic cells present in the endometrium of non-pregnant women.

METHOD: Endometrial biopsy samples from normal donors were first mechanically disrupted and filtered to generate a single-cell suspension of leukocyte-enriched endometrial cells. Cells were labeled with a panel of monoclonal antibodies, stained with propidium iodide (PI), and one- or two-color flow-cytometric analysis performed on cells excluding PI.

RESULTS: The methodology described in this study was highly reproducible in experiments evaluating the interrun and intrarun variability. We then determined the immunophenotypic profile of endometrial leukocytes from 12 normal females. The majority of leukocytes were T cells (CD3: 47%; CD4: 24%; CD8: 28%) with an important contingent of NK cells (CD56: 32%), the majority of which harbored the unusual CD16-CD56 *bright* phenotype, and a minority of B cells (CD20: 6%) and monocytes (CD14: 7%).

CONCLUSIONS: Flow cytometry can be used to assess antigen expression on the surface of endometrial leukocytes from nonpregnant women. In future studies, it will be possible to use this approach to investigate the role of immune cell populations in the endometrium of patient experiencing reproductive failure.

Key words:

Human endometrium, endometrial leukocytes, isolation technique, flow cytometry, stromal cells

M.-H. LACHAPELLE

P. MIRON

D.C. ROY

Departments of Immunology-Hematology and Obstetrics-Gynecology, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center, Université de Montréal, and Institut de Médecine de la Reproduction de Montréal

R. HEMMINGS

Institut de Médecine de la Reproduction de Montréal

C. BARON

Department of Immunology-Hematology, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

Address reprint requests to Denis-Claude Roy, Department of Immunology-Hematology Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center, 5415 l'Assomption Blvd., Montreal, Quebec, Canada H1T 2M4.

Submitted for publication February 3, 1995; accepted April 15, 1995.

INTRODUCTION

Human endometrium is infiltrated by leukocytes, which are thought to play an important role in a number of physiological and pathological conditions. Indeed, the female genital tract is in continuity with the external environment and exposed to microorganisms like bacteria and viruses; leukocytes might therefore contribute to preserve the sterility of the uterine cavity.¹ In addition, a number of hematopoietic cells show antitumor activity and could be involved in preventing the development of endometrial cancer.² Moreover, hematopoietic cells from decidua allow its infiltration by fetally derived "foreign" cells and may directly stimulate placental growth^{3,4} through secretion of various cytokines.^{2,5} Finally, some studies propose that spontaneous abortion and unexplained infertility could be ascribed to local immune dysregulation.⁶⁻⁸ Although the presence of leukocytes in normal endometrium

was documented nearly 30 years ago,⁹ still little is known about their immunologic characteristics.

The documentation of significant infiltration of normal nonpregnant endometrium by leukocytes and their evaluation by several groups led to major advances in the understanding of the physiology of human endometrium.^{1,10-17} Such progress was made possible by the development of immunohistochemical methodologies that facilitated the identification of different hematopoietic cell populations and enabled their classification according to specific cell surface markers.¹¹⁻¹⁷ In addition, these studies provided information on the tissue distribution of these cells within the endometrium.^{1,11-14,16} However, such evaluations are complicated by the fact that hematopoietic cells represent only a small proportion of endometrial cells. Other complementary methods are needed to help characterize cell surface molecules on endometrial leukocytes. Interestingly, flow cytometry has been used with success to characterize the cellular components of other tissues, including human first-trimester^{21,26} and term decidua.^{22,23} Because flow cytometry enables rapid processing and quantitative analysis of large numbers of cells, it seemed an appealing approach for the immunophenotypic evaluation of endometrial leukocytes.

In the present study, we describe a methodology for the enrichment of endometrial hematopoietic cells and the flow-cytometric evaluation of these populations from nonpregnant human endometrium. The whole procedure is highly reproducible and easy to perform. This method was used to determine the immunophenotype of normal endometrial leukocytes by multiparameter analysis and quantify each cell population.

MATERIALS AND METHODS

Tissue Samples

After obtaining informed consent under protocols approved by the Human Subjects Protection Committee of the Maisonneuve-Rosemont Hospital, endometrial tissue was obtained from healthy fertile women with no uterine pathology and undergoing tubal ligation or reanastomosis. Samples were obtained with a Wallach Endocell endometrial sampler (Wallack Surgical Devices, Nilford, CT). All biopsies were taken during the secretory phase of the menstrual cycle (between day 18 to 25) as confirmed by pathological examination. Samples were placed into sterile RPMI-1640 medium (Gibco, Grand Island, NY) supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco, Grand Island, NY), 2% L-glutamine and 1% penicillin-streptomycin.

Cell Isolation

Samples were first mechanically disrupted with Pyrex glass Broeck tissue grinders (Fisher, Fair Lawn, NJ). The cell suspension was then filtered through a 250 μ m stainless steel sieve (Millipore, Bedford, MA); glands were retained on the filter while the leukocyte-enriched fraction passed

through the filter. When significant numbers of red blood cells were present in the leukocyte fraction, they were lysed with an ACK solution (NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 10 mM, and EDTA 1 mM, pH 7.3).

Morphologic and Immunocytochemical Evaluation

Cells taken at different steps of the isolation procedure or sorted by flow cytometry were cytocentrifuged (Shandon Cytospin II, Pittsburgh, PA). The slides were stained with Wright-Giemsa modified stain (Sigma, St. Louis, MO) or with various monoclonal antibodies, and evaluated under an optical microscope (400 \times). Monoclonal antibodies used were directed against glandular cells (cytokeratin #14-18) (Boehringer Mannheim, Postfach, Germany), leukocytes (CD45: leukocyte common antigen) (Becton-Dickinson, San Jose, CA), and fibroblasts (5B5) (Dako Corporation, Carpinteria, CA). Antigen expression was evaluated using previously described indirect alkaline phosphatase staining techniques.¹⁸ Briefly, cytocentrifuged cells were fixed in acetone/methanol, incubated with a primary mouse monoclonal antibody (mAb), then with a secondary goat anti-mouse antibody bound to streptavidin, and revealed with biotinylated alkaline phosphatase by adding a fuchsin chromogen substrate (Universal DakoLSAB Kit, Dako Corporation, Carpinteria, CA). After counterstaining with hematoxylin, at least 300 cells were scored for antigen expression. Positive and negative controls were used for each sample and monoclonal antibody tested.

Antibody Labeling and Flow Cytometry

The following monoclonal antibodies (mAbs) directly conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) or phycoerythrin (PE) were used to analyze the surface antigens of endometrial leukocytes: anti-CD3 (T3-FITC), anti-CD4 (T4-PE), anti-CD8 (T8-FITC), anti-CD14 (MO2-FITC), anti-CD20 (B1-FITC), anti-CD56 (NKH1-PE) (Coulter Immunology, Hialeah, FL), anti-CD16 (Fc γ RIII-FITC) and anti-CD45 (LCA-FITC) (Becton-Dickinson, San Jose, CA). Labeling of cells with this panel of mAbs was performed using standard techniques.¹⁹ Briefly, 0.5×10^6 cells were incubated with mAbs for 30 min at 4°C, then washed twice, resuspended in medium and filtered on a 40 μ m nylon sieve. Prior to analysis, propidium iodide (1 μ g/ml) (Sigma, St. Louis, MO) was added to these unfixed cells, in order to exclude dead cells and debris. Samples were analyzed and sorted using a FACStar PLUS flow cytometer (Becton-Dickinson, San Jose, CA) using an argon laser operating at 488 nm with an intensity of 200 mW. Ten thousand events were analyzed in each sample. Dead cells were excluded by gating out the PI-positive cell population. Fluorescent signals were collected through a 530 \pm 15 nm filter for the FITC signals, a 575 \pm 13 nm filter for the PE signals and a 610 \pm 10 nm filter for the PI signals. Background fluorescence was determined using isotype-matched nonreactive directly conjugated mAbs (MsIg-

FITC and -PE) (Coulter Immunology, Hialeah, FL) and set at $< 3\%$ for all samples analyzed.

RESULTS

Enrichment for Endometrial Leukocytes

For all patients, approximately one-fifth of each endometrial sample was sent for pathological dating and the rest was used for immunologic studies. We have evaluated different methods to mechanically disrupt endometrial tissue and found that tissue grinders with rounded pestles provided adequate cell separation with minimum trauma to cells (data not shown). Following this mechanical separation step, the cell suspension was filtered, resulting in a leukocyte-enriched fraction. After this procedure, viability, assessed by trypan blue exclusion, was always greater than 90%. From 1 to 5 million viable cells were recovered from each sample, with a median of 3 million cells. In order to evaluate the purity of this leukocyte fraction, contamination by glandular cells was measured on cytoentrifuged cells using a mAb directed against cytokeratin #14-18 and visualized by alkaline phosphatase staining (Fig. 1a). For positive controls, we used the glandular cell fraction (cells retained on the filter) (Fig. 1b). Glandular cells, identified as cytokeratin positive cells, represented only $4 \pm 5\%$ (mean \pm SD) of cells from the leukocyte-enriched endometrial fraction (Table I). In contrast, the proportion of leukocytes, measured with an anti-CD45 mAb (Fig. 1c,d), ranged from 35% to 58%, with a mean of $46 \pm 8\%$.

Distribution of Hematopoietic Cells

In order to evaluate the nature of leukocytes obtained from endometrial tissue, we determined the proportion of mononuclear and polynuclear cells. Cytospins of the leukocyte-enriched fraction were stained with anti-CD45 mAb and counterstained with Mayer's haemalum. Only CD45-positive cells were scored to ensure that cells evaluated were leukocytes. Mononuclear cells represented the majority ($83 \pm 6\%$) of leukocytes in this fraction, with polynuclear cells representing only $17 \pm 8\%$ of leukocytes (Table II).

Flow-Cytometric Analysis

Endometrial leukocytes were then labeled with directly conjugated mAbs and evaluated by flow cytometry. Using a combination of forward and side scatter, we could detect a majority of events at the bottom of the scattergram and already locate our target cell population (Fig. 2a). However, a number of events were also detected in the upper left portion of the plot. When we excluded dead cells and debris from the window by gating out PI-positive events (Fig. 2b), we obtained a clear delineation of our leukocyte population. In order to verify that our gating procedure did not exclude a significant proportion of leukocytes, the leukocyte-enriched fraction was labeled with a pan-leu-

kocyte mAb (anti-CD45) and back-gating performed.²⁰ As shown in Figure 2c, 93% of CD45+PI- cells were present within the homogeneous population of cells gated. When repeated with samples from six different donors, a mean of 92% CD45+ cells from the whole PI- cell population was detected within this gate. Finally, to confirm the nature of these cells, we sorted CD45+PI- and CD45-PI- cells. Sorted samples were cytoentrifuged and stained with anti-cytokeratin and 5B5 mAbs to measure their content in glandular cells and fibroblasts, respectively. Flow-sorted CD45+ cells consisted primarily of leukocytes with less than 1% fibroblasts and glandular cells. In contrast, CD45- cells were mostly fibroblast-derived cells ($64 \pm 6\%$ 5B5+ cells) and glandular cells ($36 \pm 5\%$ cytokeratin+ cells) (N = 5 experiments). Therefore, these observations confirm that our gating strategy was appropriate for the immunologic evaluation of leukocytes.

We subsequently evaluated target antigen expression by labeling cells with a panel of monoclonal antibodies and then with PI. Figure 3 shows the analysis of an endometrial leukocyte sample stained with FITC- or PE-conjugated mAbs directed against T and B lymphocytes, natural killer (NK) cells and monocytes/macrophages. The percentage of antigen-positive cells as well as the intensity of fluorescence could be clearly measured.

Reproducibility

To assess the reproducibility of the whole procedure, including leukocyte-enrichment step, antibody labeling and flow-cytometric analysis, endometrial biopsy samples were divided in two and each portion processed independently. Expression of five different cell surface antigens was measured by flow cytometry on samples from four different donors (Table IIIa). For each patient and monoclonal antibody utilized, the variation in the percentage of antigen-positive cells was low, ranging from 0 to a maximum of 6%. The mean difference in all percentages was only 3.4%. In order to determine if endometrial biopsies could be evaluated on the day following tissue sampling, endometrial biopsies from four patients were also divided in two and either processed on the same day or kept in medium at 4°C and evaluated one day later. As shown in Table IIIb, postponing manipulation of the sample had no major impact on the percentage of antigen positive cells detected by all monoclonal antibodies tested, a finding that could contribute to render this approach even more clinically accessible.

Immunologic Characterization of Normal Subjects

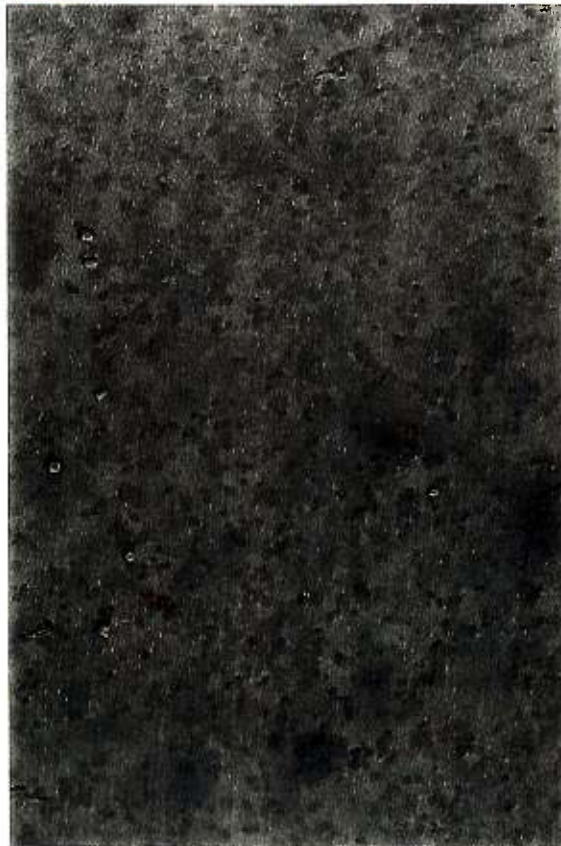
The present methodology was then used to determine the immunophenotypic characteristics of normal endometrial leukocytes from 12 nonpregnant normal women. Endometrial biopsies were obtained from previously fertile subjects without uterine pathologies. In order to maintain maximum consistency, all samples were obtained during the secretory phase, as confirmed by pathological dating.



A



B



C



D

TABLE I. Immunocytochemical Evaluation of Leukocytes and Glandular Cells After Mechanical Separation

Patient	Glandular Cells (% cytokeratin+) (mean \pm SD)	Leukocytes (% CD45+) (mean \pm SD)
1	3 \pm 2	52 \pm 6
2	18 \pm 2	53 \pm 6
3	0 \pm 0	35 \pm 1
4	1 \pm 0	35 \pm 1
5	1 \pm 1	51 \pm 3
6	1 \pm 1	53 \pm 2
7	1 \pm 0	41 \pm 4
8	7 \pm 2	58 \pm 2
9	0 \pm 0	38 \pm 1
Total	4 \pm 5	46 \pm 8

As shown in Figure 4, the majority of cells analysed were CD45+ (79 \pm 7%) (mean \pm SD) leukocytes. CD3+ T lymphocytes represented 47 \pm 6% of the leukocyte-enriched fraction with approximately equal numbers of CD4+ (24 \pm 5%) helper/inducer T cells and CD8+ (28 \pm 5%) suppressor/cytotoxic T cells. In a few patients, CD8+ cells were distributed over two peaks with different intensity of fluorescence (Fig. 3c); but in most patients, a single homogeneous peak of fluorescence was observed. Nevertheless, the latter group had either CD8 *dim* or *bright* cells documented. Such a finding suggests that two CD8+ cell populations (*dim* and *bright*) can be found in normal endometrium, either independently or together.

The mean percentage of CD56+ cells was 32 \pm 8%. By two-color flow-cytometric analysis, we could identify a majority of CD56+CD3- NK cells (84%) with only a minority of CD56+CD3+ cells (16%), which could correspond to non-major histocompatibility complex (MHC) restricted cytotoxic T cells (data not shown). However, the majority of T cells harbored the usual CD3+CD56- phenotype. The monocyte/macrophage cell population expressing CD14 was detected on 7 \pm 6% of cells. CD20, a pan-B cell antigen, was found on only 6 \pm 4% of cells.

Donor characteristics were also evaluated to determine if they played a role in the distribution of the different leukocytes. There were no differences in surface antigens present on either T, B, NK, or monocyte cell populations

and sub-populations between patients sampled during the early and late secretory phase. Age and number of previous pregnancies or spontaneous abortions also did not impact on immunophenotyping results (data not shown).

Natural Killer Cell Population

Using two color flow-cytometric analysis, we determined whether CD56+ cells also expressed Fcy RIII (CD16). In healthy fertile women, only 20% of CD56+ endometrial cells expressed CD16 (N = 7) (Fig. 5). The amount of CD56 antigen expressed on NK cells was then evaluated by measuring the intensity of CD56 fluorescence and dividing them between CD56 *dim* and CD56 *bright* cells. Only 28% of NK cells were found to be CD56 *dim* (N = 12). Thus, the majority of NK cells present in normal nonpregnant endometrium are CD16-CD56 *bright* NK cells.

DISCUSSION

Human endometrium can be divided into glandular and stromal elements. The stromal fraction contains a mixture of fibroblast-derived cells and a diverse population of hematopoietic cells thought to originate primarily from the bone marrow.¹⁰ In this study, we were able to develop a methodology for the flow-cytometric evaluation of hematopoietic cells present in human nonpregnant endometrium.

Several methods have been developed to dissociate leukocytes from various tissues; the majority rely on physical or enzymatic procedures. Most enzymatic techniques use collagenase and/or trypsin, and yield high cell numbers.^{10,24,25} Such methods have been used most effectively to establish primary cell cultures of stromal as well as glandular elements.^{10,24,25} We were still concerned that such enzymatic treatment could cleave some cell surface antigenic determinants. Indeed, when we treated peripheral blood mononuclear cells with collagenase or trypsin, and determined the proportion of antigen positive cells by flow cytometry, a number of cell surface structures were unaffected (CD3, CD14, and CD20), but the proportion of some antigen-positive cells (CD56, CD4, and CD8) decreased following enzymatic treatment (data not shown). Such a process may not occur with endometrial leukocytes if target cells are protected from digestion by surrounding tissue. Nevertheless, this possibility has motivated several groups to implement culture methods with the intent to re-

Fig. 1. Immunocytochemical analysis of the leukocyte-enriched cell fraction. Contamination by glandular cells was measured using a mAb against cytokeratin #14-18. A) Only a very small proportion of cells in the leukocyte-enriched fraction are glandular cells (red). B) Glandular cells retained on the filter were used as positive control: all cells are strongly positive for cytokeratin. C) The leukocyte-enriched fraction was predominantly composed of mononuclear cells positive for leukocyte common antigen (CD45) (red). D) Peripheral blood was used as controls: all nucleated cells are leukocytes which stained positive for CD45.

TABLE II. Distribution of Leukocyte Populations After Mechanical Separation

Cell Type (N=5)	CD45 Positive Cells	
	Mean \pm SD (%)	Range (%)
Mononuclear cells	83 \pm 6	70-96
Polynuclear cells	17 \pm 8	4-30

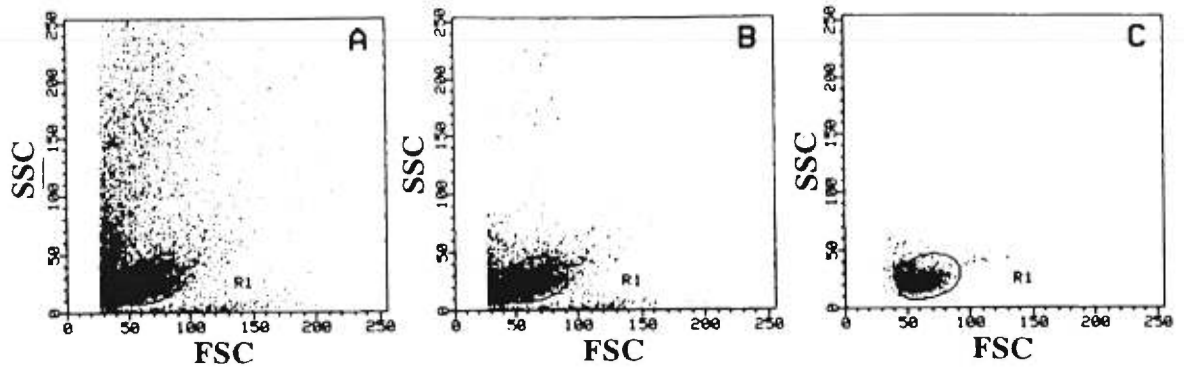


Fig. 2. Characterization of endometrial leukocyte populations using FACScan. A) Dot plot of processed leukocyte-enriched fraction dispersed using a combination of forward (FSC) and side light scatter

(SSC). B) Dot plot of the same leukocyte fraction after gating out PI positive events. C) Back-gating of CD45+PI- cells confirming that the majority of CD45+ cells localize within the gate.

store cell surface antigen integrity.^{10,24,25} These techniques are, however, complex and can only be performed in a few highly specialized centers. With these concerns, we rather opted for a nonenzymatic cell isolation method. This method consists of mechanical disruption, followed by sequential filtrations to remove glandular elements, as derived from other protocols.^{10,24,25} Using this procedure, the mean proportion of contaminating glandular cells was decreased to below 5%. In addition, the mean percentage of leukocytes increased to 46%, resulting in significant enrichment from the 20–25% of leukocytes usually observed in sections of endometrial tissue.¹

We were concerned with possible variability in the mechanical separation procedure and also flow-cytometric evaluation of hematopoietic cells obtained from endometrial biopsies. However, when samples were separated in two and processed independently, immunophenotyping results were highly reproducible for all antigens and patients evaluated. We could identify slight differences between the percentages obtained for a given antigen, but results were always within 6% of each other, which is consistent with variations obtained in flow-cytometric analysis of cells from other tissues.²⁰ In addition, we could not rule out the possibility that small variations in the distribution of he-

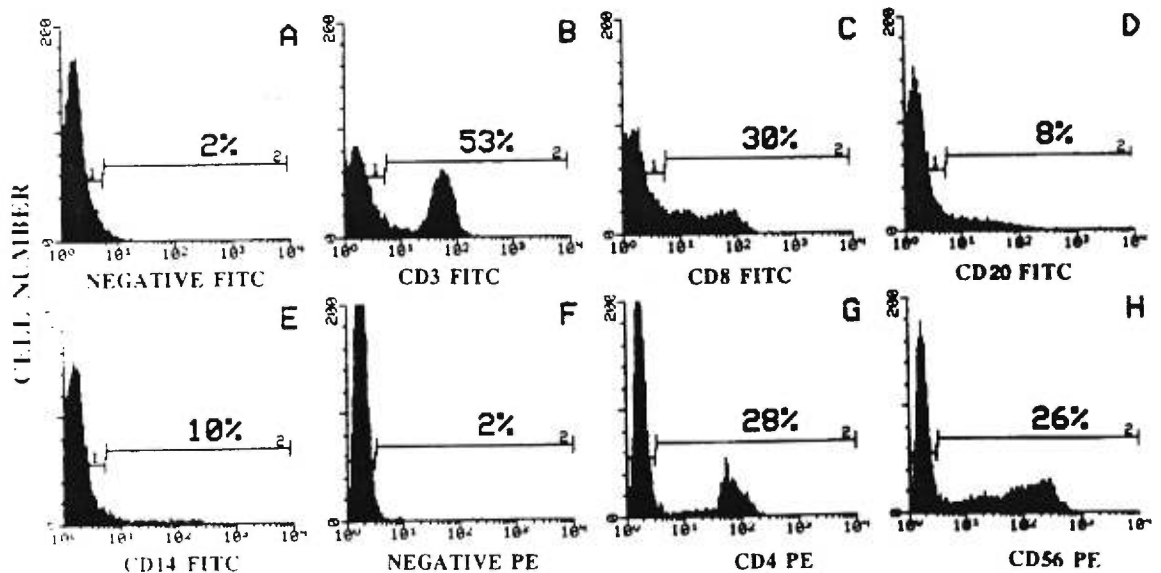


Fig. 3. Log scale fluorescence histograms of endometrial leukocytes from a representative endometrial sample. Flow-cytometric analysis was performed after labeling with a panel of mAbs: FITC labeled: A) IgG

control, B) CD3, C) CD8, D) CD20, E) CD14; and PE labeled: F) IgG control, G) CD4, and H) CD56. The horizontal bar (2) indicates the region for antigen positive cells.

TABLE III. Reproducibility of the Technique

A) Samples (A and B) processed independently on the same day

Antigen	Patient ^a									
	C.B.		N.S.		M.R.		C.M.		Mean	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
CD45	83	89	94	90	69	72	72	72	80	81
CD3	53	52	46	42	45	40	42	48	47	46
CD4	25	22	17	13	26	23	22	22	23	20
CD8	32	29	31	33	22	26	22	23	27	28
CD56	40	40	28	34	39	36	38	35	36	36

B) Samples (C and D) processed independently on 2 different days^b

Antigen	Patient									
	N.D.		C.T.		C.B.		M.B.		Mean	
	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D
CD45	83	88	99	92	87	86	82	86	88	88
CD3	50	47	62	57	65	63	51	47	57	54
CD4	31	34	35	37	40	37	31	35	34	36
CD8	24	20	29	27	26	28	26	26	25	25
CD56	31	34	24	22	24	20	30	29	27	26

^aPatient's initials.

^bC = day of endometrial sampling, D = day following endometrial biopsy.

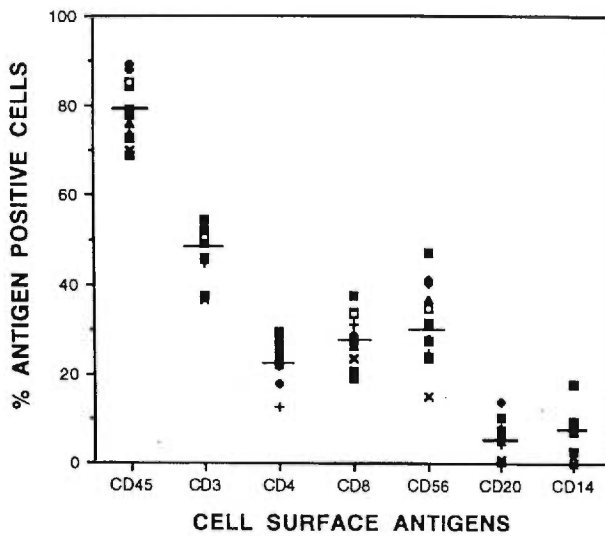


Fig. 4. Flow-cytometric evaluation of leukocyte populations from normal nonpregnant human endometrium (N = 12 donors). The percentage of antigen positive cells is plotted for each individual subject (mean percent = —).

matopoietic cells in the endometrial biopsy material were responsible for the differences observed. Finally, when results from samples evaluated on the day of the biopsy were compared to results from the other fraction of the same sample that was kept in medium and tested on the following day, variability was low, suggesting that manipulation of biopsy samples could be postponed to the following day. Such a delay would certainly facilitate laboratory work and broaden the applicability of such immunophenotyping studies.

The endometrium being highly vascularized tissue, peripheral blood leukocytes could potentially leak into the endometrial cell sample. In this instance, the distribution of hematopoietic cells in the leukocyte-enriched endometrial fraction would closely approximate that observed in peripheral blood. Comparing mononuclear cell content, we noted that the endometrial cell fraction was composed of a mean of 83% mononuclear cells, with all samples showing more than 70% mononuclear leukocytes. These results are in sharp contrast with the 35% of mononuclear cells usually observed in peripheral blood. Furthermore, the proportion of NK cells (32%) in the endometrium was much higher, and the CD4/CD8 ratio much lower, than those documented in peripheral blood samples. These results show not only that leukocyte populations in endometrium differ from those in peripheral blood, but also suggest that, although contamination of endometrial samples by peripheral blood cells cannot be totally excluded, it is most likely not important.

Among normal endometrial hematopoietic cells, we documented a majority of CD3+ (47 ± 6%) T lymphocytes and CD56+ (32 ± 8%) NK cells. This high proportion of

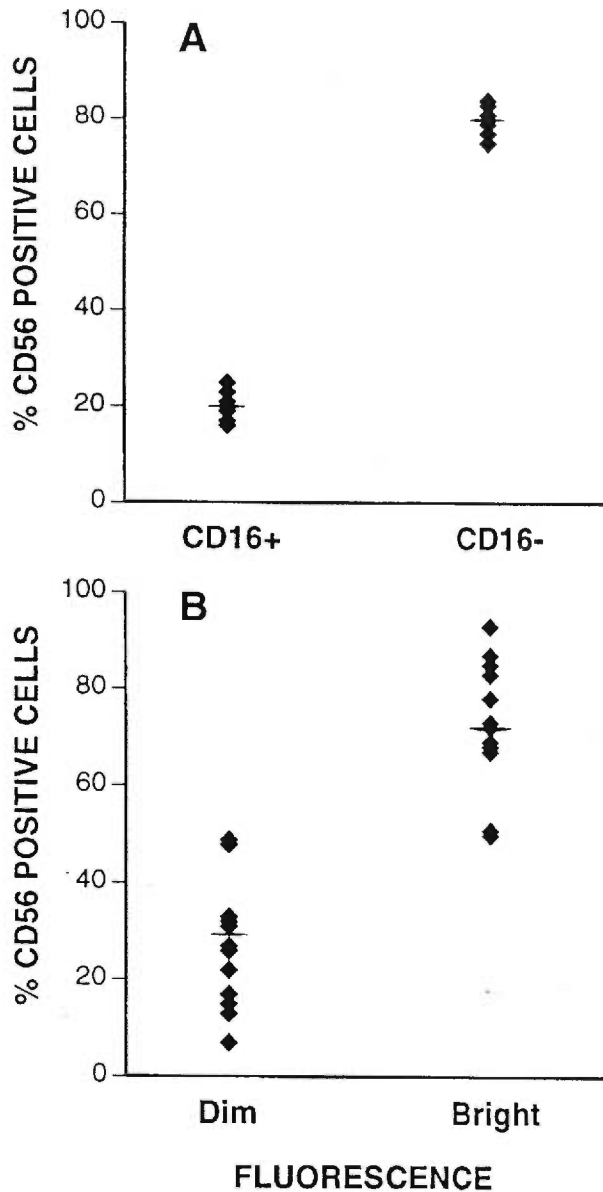


Fig. 5. Characterization of NK cell subsets. A) Expression of CD16 antigen on CD56+ cells was evaluated using two color flow-cytometry (N = 7). The majority of CD56+ cells were CD16 negative. B) Evaluation of the intensity of CD56 fluorescence showed that most endometrial NK cells were predominantly CD56 bright (N = 12).

T cells in normal nonpregnant endometrium concurs with the qualitative results reported by Bonatz et al.¹¹ and Kamat et al.¹ using immunohistochemical techniques. Similarly, King¹³ reported approximately 45% of NK cells in secretory endometrium.¹³ With flow cytometry, we were also able to easily determine the proportion of CD4, CD8, CD14, and CD20 positive cells in this normal donor population. Two-color monoclonal antibody labeling could also be used to determine that more than 80% of CD56+ cells

were also CD3- and confirm the non-MHC restricted nature of these cells. Interestingly, CD8+ cells were found to display either *dim* or *bright* fluorescence, and some patients presented both CD8 fluorescence patterns. These results suggest that two populations of CD8+ cells can infiltrate normal endometrium. In future studies, it will be important to ascertain the nature of these cells and determine if they belong to T or NK lineages.²⁸

In human decidua during early pregnancy, investigators have demonstrated that approximately 75% of lymphocytes are CD16-CD56 *bright* NK cells.^{4,21} Cells with such a phenotype are also found in peripheral blood; however, they usually represent only 1% of lymphocytes and 10% of NK cells.²⁷ We have thus evaluated endometrial NK cells from secretory endometrium to determine their cell surface antigen characteristics and found that approximately 80% of CD56+ cells were CD16-CD56 *bright* cells. Our study therefore identified CD16-CD56 *bright* cells as the predominant NK cell population in normal nonpregnant endometrium. Detection of NK cells with the same immunophenotypic characteristics in both secretory endometrium and in decidua suggests that this unusual phenotype is not a reactive phenomenon to the conceptus but most probably the consequence of intrinsic endometrial conditions.

These studies show that flow-cytometry can be used to assess cell surface antigens characterizing the different leukocyte populations found in nonpregnant endometrium, and that it could be performed to further define each different lymphoid subset. In addition, our results have allowed us to determine the immunophenotypic profile of endometrial leukocytes in normal fertile women. This information will serve as reference in future studies evaluating immune regulation in the endometrium of women with reproductive disorders.

The advantages of flow-cytometric evaluation of hematopoietic cells in nonpregnant endometrium include fast, efficient, and quantitative assessment of large numbers of monoclonal antibody labeled cells. Moreover, flow-cytometry facilitates standardization, minimizes interobserver variability, and supports large scale processing of numerous samples. Another advantage of flow cytometry is its capacity to detect multiple antigens simultaneously on a single cell; such multiparameter analysis will contribute to improve the immunologic characterization of specific cell populations. Finally, this methodology opens the way to cell sorting, a strategy with outstanding opportunities for the evaluation of the proliferative and cytotoxic potential of endometrial leukocytes. Therefore, the methodology described in this study offers an opportunity to further our understanding of the immunologic components involved in various gynecological disease processes.

Acknowledgments

Supported by a grant from the Institut de Médecine de la Reproduction de Montréal and Maisonneuve-Rosemont

Hospital Foundation. D.C.R. is a scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. The authors thank the Obstetricians-Gynecologists and nurses of Maisonneuve-Rosemont Hospital and Institut de Médecine de la Reproduction de Montréal for their help in providing endometrial tissue for this study. Also, the authors are grateful to Anick Hebert and Christiane Le Houillier for excellent technical assistance.

REFERENCES

1. Kamat BR, Isaacson PG. The immunocytochemical distribution of leukocytic subpopulations in human endometrium. *Am J Pathol* 1987; 127:66-73.
2. Herberman RB, Ortaldo JN. Natural killer cells: their role in defenses against disease. *Science* 1981; 214:24-30.
3. Athanassakis I, Blenchley RC, Patetkan V, Guilbert L, Barr PJ, Wegmann TG. The immunotrophic effect of T cells and T cell lymphokines on murine fetally derived placental cells. *J Immunol.* 1987; 138:37-44.
4. Saito S, Nishikawa K, Morii T, Enomoto M, Narita N, Motoyoshi et al. Cytokine production by CD16-CD56bright natural killer cells in the human early pregnancy decidua. *Int Immunol* 1993; 5:559-563.
5. Wegmann TG, Athanassakis I, Guilbert L, Branch O, Dy M, Menu E, Chaouat G. The role of M-CSF and GM-CSF in fostering placental growth, and fetal survival. *Transplant Proc* 1989; 1:566-568.
6. Hill JA, Polgar K, Harlow L, Anderson DJ. Evidence of embryo- and trophoblast-toxic cellular immune response(s) in women with recurrent spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166:1044-1052.
7. Fraser EJ, Grimes DA, Schulz KF. Immunization as therapy for recurrent spontaneous abortion: A review and meta-analysis. *Obstet Gynecol* 1993; 82:854-859.
8. Coulam CB. Immunologic tests in the evaluation of reproductive disorders: A critical review. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167:1844-1851.
9. Rahn J. On the nosological evaluation of infiltrates of the human endometrium. *Gegenbaurs. Morphol Jahrb* 1968; 111:605-609.
10. Fernandez-Shaw S, Shorter SC, Naish CE, Barlow DH, Starkey PM. Isolation and purification of human endometrial stromal and glandular cells using immunomagnetic microspheres. *Human Reprod* 1992; 7:156-161.
11. Bonatz G, Hansmann ML, Buchholz F, Mettler L, Radzun HJ, Semm K. Macrophage- and lymphocyte-subtypes in the endometrium during different phases of the ovarian cycle. *Int J Gynecol Obstet* 1992; 37:29-36.
12. Bulmer JN, Lunny DP, Hagin S. Immunohistochemical characterization of stromal leucocytes in nonpregnant human endometrium. *Am J Reprod Immunol* 1988; 17:83-90.
13. King A, Wellings V, Gardner L, Loke YW. Immunocytochemical characterization of the unusual large granular lymphocytes in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Human Immunol* 1989; 24:195-205.
14. Pace D, Longfellow M, Bulmer JN. Characterization of intraepithelial lymphocytes in human endometrium. *J Reprod Fertil.* 1991; 91:165-174.
15. Segerson EC, Matterson PM, Gunsett FC. Endometrial T-lymphocyte subset infiltration during the ovine estrous cycle and early pregnancy. *J Reprod Immunol* 1991; 20:221-236.
16. Tabibzadeh S. Distinct subsets of stromal cells confined to unique microenvironments in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Am J Reprod Immunol.* 1991; 26:5-10.
17. Van Eijkeren MA, Peters PJ, Geuze HJ. Polarized expression of major histocompatibility complex class I molecules in human endometrial and endocervical epithelial cells. *Eur J Immunol.* 1991; 21:3049-3052.
18. Ponder BA. Inhibition of endogenous tissue alkaline phosphatase with the use of alkaline phosphatase conjugates in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 1981; 29:981-985.
19. Roy DC, Tantravahi R, Murray C, Dear K, Gorgone B, Anderson KC et al. Natural history of mixed chimerism after bone marrow transplantation with CD6-depleted allogeneic marrow: a stable equilibrium. *Blood* 1990; 75:296-304.
20. Melamed MR, Lindmo T, Mendelsohn ML. *Flow Cytometry and Sorting*, 2nd ed. New York, Wiley-Liss, 1990.
21. Starkey PM, Sargent IL, Redman CWG. Cell populations in human early pregnancy decidua: characterization and isolation of large granular lymphocytes by flow cytometry. *Immunology* 1988; 65:129-134.
22. Vince GS, Starkey PM, Jackson MC, Sargent IL, Redman CWG. Flow cytometric characterisation of cell populations in human pregnancy decidua and isolation of decidual macrophages. *J Immunol Methods* 1990; 132:181-189.
23. Norwitz ER, Starkey PM, Lopez Bernal A, Turnbull AC. Identification by flow-cytometry of the prostaglandin-producing cell populations of term human decidua. *J Endocrinol* 1991; 131:327-334.
24. Satyaswaroop PG, Bressler RS, de la Pena MM and Gurdip E. Isolation and culture of human endometrial glands. *J Clin Endocrinol Metab* 1979; 48:639-641.
25. Matthews CJ, Redfern CPF, Hirst BH, Thomas EJ. Characterization of human purified epithelial and stromal cells from endometrium and endometriosis in tissue culture. *Fertil Steril* 1992; 57:990-997.
26. Maruyama T, Makino T, Sugi T, Iwasaki K-I, Ozawa N, Matsubayashi H, Nozawa S. Flow cytometric crossmatch and early pregnancy loss in women with history of recurrent spontaneous abortions who underwent paternal leukocyte immunotherapy. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 168:1528-1536.
27. Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1986; 136:4480-4487.
28. Gottschalk LR, Kaizer H, Gebel HM. Characterization of peripheral blood CD8/11 cells in bone marrow transplant recipients. *Transplantation* 1988; 45:890-894.

Endometrial T, B, and NK Cells in Patients with Recurrent Spontaneous Abortion

Altered Profile and Pregnancy Outcome¹

Marie-Hélène Lachapelle,^{*†‡} Pierre Miron,^{*†} Robert Hemmings,^{*} and Denis Claude Roy^{2*†}

Several lines of evidence indicate that immunologic effectors, particularly suppressor T cells and NK cells, may play a role in the pathogenesis of idiopathic repetitive abortions. To investigate the involvement of these immune cell populations, we determined the immunophenotypic characteristics of endometrial leukocytes from nonpregnant recurrent aborters. Habitual aborters with a negative investigation underwent an endometrial biopsy during their secretory phase and were followed prospectively to assess clinical outcome. Endometrial leukocytes were evaluated by two-color flow cytometric analysis. The percentage of endometrial CD8⁺ T lymphocytes was significantly decreased in recurrent aborters, and their CD4:CD8 ratio was increased. In contrast, the proportion of B lymphocytes (CD20⁺) was strikingly increased in these patients' endometria. The proportion of NK cells was identical in recurrent aborters and normal controls, but the CD16⁻CD56^{bright} NK cell subset, which is predominant in normal decidua and endometrium, was significantly decreased in favor of an important contingent of CD16⁺CD56^{dim} NK cells in all habitual aborters. Repetitive aborters who had normal CD8⁺ and CD20⁺ cell numbers and a normal CD4:CD8 ratio subsequently underwent successful pregnancies, while patients with continuing abortions presented lymphoid populations observed in the habitual aborters group. In conclusion, endometrial lymphocytes of recurrent spontaneous aborters harbor a distinct immunophenotypic profile that antedates implantation and suggests that endometrial immunologic conditions are intrinsically altered in recurrent aborters. Also, the prognostic impact of CD8 and CD20 expression supports their predominant role in the development of fetal tolerance. Finally, a role for NK cells in the abortion process is suggested by their altered subsets in all repetitive aborters. *The Journal of Immunology*, 1996, 156: 4027–4034.

Recurrent spontaneous abortions occur in 1 to 2% of the child-bearing population (1). Chromosomal aberration is the principal cause of fetal loss during the early stage of gestation (2). Other etiologies, which include anatomic anomalies, endocrine disorders, and infections, have also been documented in patients with recurrent fetal losses (3). Nevertheless, in 40 to 60% of couples, repetitive abortions remain unexplained (4).

Immune cells are abundant in human decidua and are capable of responding to allogeneic stimulation, such as that of the fetus (5–9). Therefore, to maintain pregnancy, the fetus is normally protected from maternal immunologic assaults through mechanisms that have yet to be fully elucidated (10). Studies in murine models have demonstrated that decidual cytotoxic effector cells like NK cells, monocyte/macrophages, and T cells could be implicated in fetal resorption (11–16). In humans, few data are available on the implication of lymphoid and other hemopoietic cells in the abor-

tion process. Nevertheless, it has been shown that trophoblast-stimulated PBMC exhibit proliferation and embryotoxic factor production in the majority of women with recurrent spontaneous abortion, but none of the normal controls (17). Moreover, anti-CD5, -CD16, and -CD14 mAbs were shown to inhibit the cytotoxic activity of peripheral blood cells from habitual aborters against placental cells, implicating T cells, NK cells, and monocytes/macrophages (10). Controversy persists, however, about the involvement of immune cells in the pathophysiology of repetitive abortions.

To clarify the immunologic role of endometrial leukocytes in repetitive abortions of unknown etiology, we have undertaken an analysis of the immunophenotypic characteristics of T and B lymphocytes, NK cells, and monocytes in the endometrium of 20 patients with recurrent abortions and prospectively evaluated their clinical outcome. Patients were studied while nonpregnant in order to determine if endometrial immune disturbances antedated fetal implantation and correlated with subsequent abortions. Moreover, patients were prospectively evaluated during a mean period of 13 mo after the endometrial biopsy and we determined whether leukocyte populations had an impact on the outcome of pregnancy. The documentation of an altered distribution of immune cells in nonpregnant endometrium of habitual aborters suggests that these cells 1) are present before conception, 2) do not seem to prevent fertilization or implantation, but 3) contribute to create a hostile immune environment ultimately leading to fetal loss.

Materials and Methods

Patients

After obtaining informed consent under protocols approved by the Human Subjects Protection Committee of the Maisonneuve-Rosemont Hospital,

^{*}Montreal Institute of the Medicine of Reproduction, [†]Department of Obstetrics-Gynecology and [‡]Division of Immunology-Hematology, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Department of Medicine, University of Montréal, Montreal, Quebec, Canada

Received for publication October 10, 1995. Accepted for publication February 26, 1996.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by a grant from the Institut de Médecine de la Reproduction de Montréal and Maisonneuve-Rosemont Hospital Foundation; Montreal, Canada. D.C.R. is a scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Denis C. Roy, Institut de Médecine de la Reproduction de Montréal, 1100 Beaumont, Bureau 305, Montreal, Quebec, Canada H3P 3H5.

Table I. Patient characteristics

Patient	Mean \pm SD (Range)			p Value ^a		
	Primary aborters (<i>n</i> = 11)	Secondary aborters (<i>n</i> = 9)	Normal donors (<i>n</i> = 15)	a	b	c
Age	30 \pm 4 (22–37)	33 \pm 2 (26–39)	35 \pm 4 (27–40)	NS	NS	NS
Gravida	4 \pm 1 (3–6)	5 \pm 1 (4–6)	3 \pm 1 (2–4)	NS	NS	NS
Para	0	1	3 \pm 1 (1–4)	NS	<0.05	NS
Abortions	4 \pm 1 (3–6)	4 \pm 1 (3–5)	0.3 \pm 0.5 (0–1)	NS	<0.05	<0.05

^a a = primary vs secondary aborters; b = primary aborters vs normal donors; c = secondary aborters vs normal donors.

endometrial biopsies were obtained from either idiopathic recurrent aborters or normal individuals. Habitual aborters were defined as women with a history of three or more unexplained, consecutive, first trimester spontaneous abortions with the same partner. A complete medical, surgical, and social history was obtained from all patients evaluated in this study. Also, all couples had peripheral blood chromosome assessment using standard banding techniques. All patients underwent hysterosalpingography, followed by hysteroscopy when indicated. Luteal phase defects were excluded by a mid-luteal-phase endometrial biopsy timed with urinary luteinizing hormone surge. Women with infectious (viral and other) or autoimmune diseases were excluded. In addition, all women had cervical cultures for *Mycoplasma* and *Ureaplasma*, and blood was obtained to measure levels of thyroid-stimulating hormone, prolactin, and autoantibodies (circulating anticoagulants, anti-phospholipid Abs and anti-nuclear Abs). All patients with a normal profile of investigation were classified as unexplained repetitive aborters. Normal controls consisted of 15 healthy fertile women with no uterine pathology undergoing tubal ligation or reanastomosis.

Tissue samples

Endometrial samples were obtained with a Wallach endocell endometrial sampler (Wallach Surgical Devices, Milford, CT). All biopsies were taken during the secretory phase of the menstrual cycle, at least two cycles after hysterosalpingography, and before hysteroscopy. Samples were obtained between days 18 and 25, at a mean (\pm SD) of 21 \pm 1 days for repetitive aborters and 21 \pm 3 days for controls, as confirmed by pathologic examination. Samples were placed into sterile RPMI 1640 medium (Life Technologies, Grand Island, NY) supplemented with 10% FCS (Life Technologies), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin.

Cell isolation

Endometrial leukocytes were isolated and analyzed as previously described (18). Briefly, samples were first mechanically disrupted with a round pestle tissue grinder (Fisher Scientific Co., Fair Lawn, NJ). The cell suspension was then filtered through a 250- μ m pore size stainless steel sieve (Millipore Corp., Bedford, MA) in order to generate a leukocyte-enriched fraction.

Ab labeling and flow cytometry

The following mAbs directly conjugated with FITC or phycoerythrin (PE)³ were used to analyze the surface Ags of endometrial leukocytes: anti-CD3 (T3-FITC), anti-CD4 (T4-PE), anti-CD8 (T8-FITC), anti-CD14 (MO2-FITC), anti-CD20 (B1-FITC), anti-CD56 (NKH1-PE) (Coulter Immunology, Hialeah, FL), anti-CD16 (Leu-11a-FITC), and anti-CD45 (leukocyte common Ag-FITC) (Becton Dickinson, San Jose, CA). Labeling of cells with this panel of mAbs was performed using standard techniques (18). Briefly, 0.5×10^6 cells were incubated with mAbs for 30 min at 4°C, washed, and filtered with a 40- μ m pore size nylon sieve. Before analysis, propidium iodide (1 μ g/ml) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) was added to these unfixed cells in order to exclude dead cells and debris. Immunofluorescence reactivity was determined by flow cytometry (FACStar^{Plus}, Becton Dickinson) analyzing 10^4 cells in each sample. Dead cells were excluded by gating out the propidium iodide-positive events. Flow cytometric analysis was performed with an argon laser operating at 488 nm with an intensity of 200 mW. Background fluorescence was determined using isotype-matched nonreactive directly conjugated mAbs (Mslg-FITC and Mslg-PE) (Coulter) and set at <3% for all samples analyzed.

³ Abbreviations used in this paper: PE, phycoerythrin; Mslg, mouse immunoglobulin.

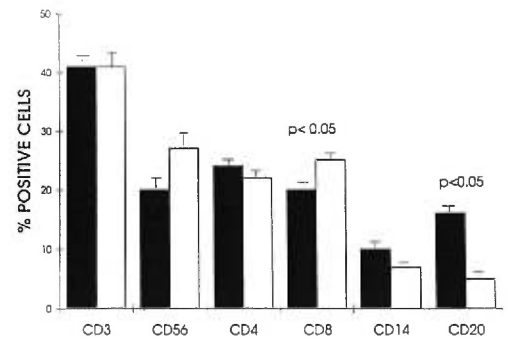


FIGURE 1. Flow cytometric evaluation of endometrial leukocytes from recurrent aborters and fertile controls. The percentage (mean \pm SD) of Ag-positive cells was measured in 20 recurrent aborters (black columns) and 15 healthy fertile women (white columns).

Statistical analysis

Statistical significance between the experimental and control groups was determined using Student's *t* Test. The level for a statistically significant difference was set at $p < 0.05$.

Results

Patient characteristics

Subjects in this study included aborters who had suffered from three or more consecutive spontaneous abortions in the first trimester ($n = 20$) and normal fertile women ($n = 15$). All patients had undergone extensive evaluations to exclude potential causes of abortion. Of these patients, nine had one child prior to spontaneous abortions (secondary aborters). Clinical parameters between primary aborters, secondary aborters, and normal controls were not significantly different (Table I), except for the mean number of spontaneous abortions which, as expected, was significantly higher in primary and secondary aborters in comparison with normal controls ($p < 0.05$).

Leukocyte population

We determined the distribution of endometrial leukocyte populations by performing two-color flow cytometric analysis on samples of secretory endometrium from 20 recurrent aborters and 15 healthy fertile women. To measure the proportion of leukocytes in each sample, we determined the percentage of CD45⁺ cells. CD45⁺ cells represented 81 \pm 9% (mean \pm SD) of cells evaluated for habitual aborters and 79 \pm 5% in normal controls. As shown in Figure 1, the major leukocyte population detected in nonpregnant aborters consisted of T lymphocytes with 41 \pm 4% (mean \pm SD) CD3⁺ cells, as in fertile controls (41 \pm 10%). The proportion of CD8⁺ T cells was, however, significantly lower in recurrent

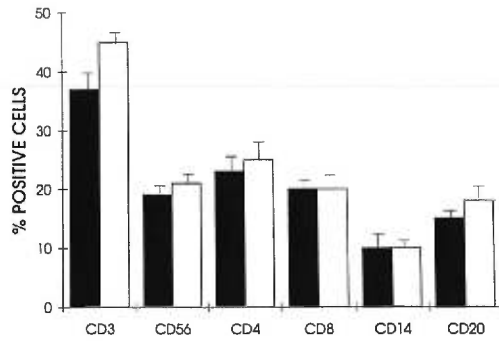


FIGURE 2. Leukocyte populations in primary vs secondary aborters. The immunophenotypic profile of endometrial leukocytes from 11 primary aborters (black) was compared with that of nine secondary aborters (white). There was no statistical difference between cell populations from either groups.

aborters ($20 \pm 6\%$) than in normal individuals ($25 \pm 8\%$) ($p < 0.05$). Remaining T cells were $CD4^+$ with similar numbers obtained in repetitive aborters and controls. To ensure that these differences were not attributable to intersample variability in leukocyte content, all Ags were also expressed as fractions of the total number of $CD45^+$ cells. $CD8^+$ cells represented $21 \pm 4\%$ of $CD45^+$ cells in repetitive aborters, a number again much lower than the $29 \pm 8\%$ of the control group ($p < 0.05$) (data not shown). In a previous study, we had noted that the intensity of CD8 fluorescence varied between different normal subjects (18). Similar variations in CD8 expression were also observed in repetitive aborters, and there was no difference between the two groups of subjects (data not shown). We then measured the $CD4^+ : CD8^+$ cell ratio in each sample and found it be consistently higher in repetitive aborters (1.24 ± 0.30) than in controls (0.79 ± 0.20) ($p < 0.05$).

When we assessed the percentage of B lymphocytes, we found an increased proportion of $CD20^+$ cells ($16 \pm 8\%$) in endometrial cells from recurrent aborters, a number almost three times higher than that in normal controls ($5 \pm 6\%$) ($p < 0.05$). NK cell percentages were lower in recurrent aborters than in normal women, but this difference did not reach statistical significance. Monocyte/macrophage fractions ($CD14^+$) were lowest among the hemopoietic cells evaluated with comparable numbers in both groups.

Primary vs secondary aborters

Several studies proposed that primary and secondary aborters may lose the conceptus through different immunologic mechanisms. To determine whether the endometrial leukocyte populations from recurrent aborters were altered by a previous successful pregnancy, we compared the proportion of each cell population for both groups of patients. As shown in Figure 2, no significant differences were observed between primary and secondary aborters. Age, day of sampling, and number of previous pregnancies or spontaneous abortions also did not impact on immunophenotyping results (data not shown). Thus, endometrial leukocyte content of habitual aborters does not seem to be influenced by a prior live birth.

Natural killer cell population

Using two-color flow cytometric analysis, we first verified that the majority of $CD56^+$ cells were also $CD3^+$, and could thus be clearly identified as NK cells. In the endometrium of recurrent aborters, $76 \pm 7\%$ of $CD56^+$ cells were $CD3^+$, a result similar to that of normal controls ($83 \pm 5\%$). Most T cells harbored the usual

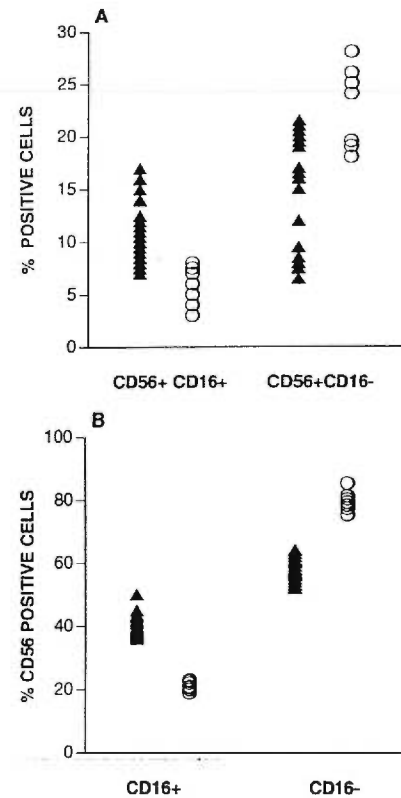


FIGURE 3. Expression of CD16 on endometrial NK cells. *A*, The percentage of cells co-expressing CD56 and CD16 was determined by flow cytometry in repetitive aborters (▲) and controls (○). A higher proportion of NK cells from recurrent aborters ($n = 17$) expressed CD16 when compared with normal fertile controls ($n = 7$) ($p < 0.05$). *B*, The percentage of $CD56^+$ cells expressing CD16 was also evaluated. There was no overlap between both patient populations.

$CD3^+CD56^-$ phenotype: $80 \pm 5\%$ in the recurrent aborters group and $87 \pm 11\%$ in the control group ($p = NS$). Since NK cells in the decidua (19–23), and also normal endometrium (18, 23–25), show unusual phenotypic characteristics, with a majority of $FCR\gamma III$ ($CD16$)-negative NK cells, we then determined whether recurrent aborters' endometrial $CD56^+$ cells co-expressed CD16 (Fig. 3A). Eleven percent ($11 \pm 3\%$) of cells evaluated in recurrent aborters were $CD56^+CD16^+$ NK cells ($n = 17$), a percentage twice higher than the $6 \pm 2\%$ measured in healthy fertile women ($n = 7$) ($p < 0.001$). Also, these patients had a lower percentage of $CD56^+CD16^-$ cells ($16 \pm 6\%$) than normal fertile women ($24 \pm 3\%$) ($p < 0.001$). In addition, there was little overlap between the percentages of each NK cell subset in individual aborters and normals. We also determined the proportion of NK cells expressing CD16. As shown in Figure 3B, habitual aborters had a much higher proportion of double-positive cells, with total absence of overlap between the two groups of subjects.

In peripheral blood, several NK cell subsets have been defined, and CD16 expression has been shown to correlate with CD56 fluorescence intensity (26, 27). To determine whether these findings applied to endometrial NK cells, CD56 fluorescence intensity was evaluated in both patients and controls. As shown in Figure 4, the proportion of $CD56^{bright}$ cells was much lower in repetitive aborters than in fertile controls ($p < 0.05$). In addition, there were fewer $CD56^{dim}$ cells than $CD56^{bright}$ cells. However, the percentage of $CD56^{dim}$ cells was identical in recurrent aborters and controls. In

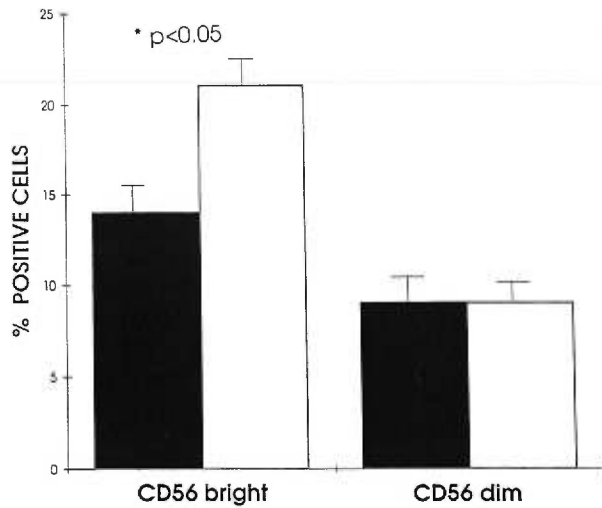


FIGURE 4. Intensity of CD56 expression in recurrent aborters. Expression of CD56 surface Ag was measured in 17 recurrent aborters (black) and 7 fertile controls (white). CD56^{bright} cells were significantly lower ($p < 0.005$) in recurrent aborters than in fertile controls.

order to explain this lack of difference in CD56^{dim} cells, we looked at flow cytometric dot-plots from patients and controls, and found that CD56^{dim} cells could be separated into CD16-positive and -negative cells (Fig. 5). In addition, CD16⁺CD56^{dim} cells were more prominent in the repetitive aborter, while CD16⁻CD56^{bright} cells represented the majority of cells in the fertile control. Combining patterns of CD16 expression and intensity of CD56 fluorescence for all patients, we could theoretically delineate four NK cell populations: CD16⁻CD56^{dim}, CD16⁻CD56^{bright}, CD16⁺CD56^{dim} and CD16⁺CD56^{bright} (Fig. 6). The majority of endometrial NK cells in recurrent aborters were CD16⁻CD56^{bright} cells, yet they were much less prominent than in controls. In contrast, the CD16⁺CD56^{dim} cells represented an important NK cell subset in recurrent aborters, with numbers approximating the CD16⁻CD56^{bright} population. These CD16⁺CD56^{dim} were also twice as numerous in aborters than in controls. CD16⁻CD56^{dim} cells represented only a minority of cells in both groups of subjects, while CD16⁺CD56^{bright} cells were practically nonexistent.

Influence of the number of abortions on endometrial lymphocytes

If repetitive abortions result from an immunization process in which cells with embryotoxic potential gradually accumulate in the endometrium with repeated antigenic exposition, we would expect endometrial immune populations to increase with the number of abortions. To test this hypothesis, we plotted the proportion of endometrial CD8, CD20, and CD56⁺CD16⁺ cells according to the number of previous abortions. As shown in Figure 7, the distribution of immune endometrial cells was not significantly affected by the number of previous abortions.

Clinical outcome

After an endometrial biopsy was obtained, patients were followed for 11 to 32 mo, with a mean of 15 mo. Table II shows that 20% of recurrent aborters had an additional abortion during follow-up, all occurring during the first trimester. However, 5 of the 20 aborters either had a live birth (4 patients) or a pregnancy longer than 36 wk (1 patient). To determine whether patients who maintained viable pregnancies beyond the first trimester could be discrimi-

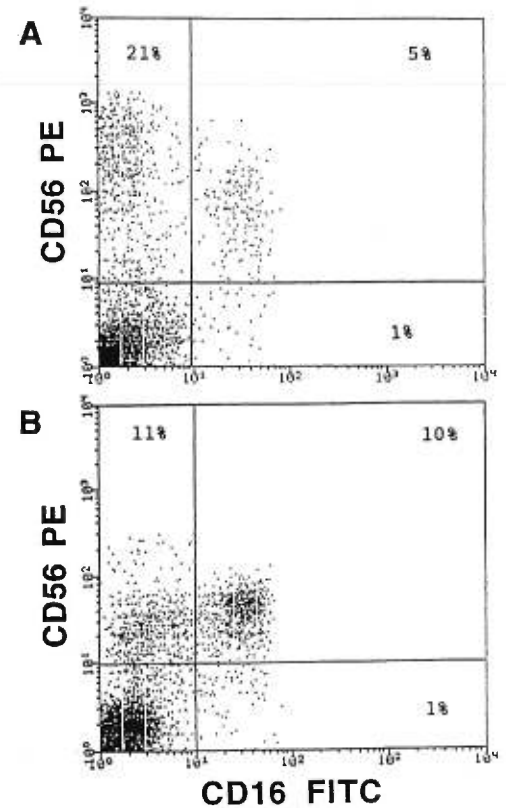


FIGURE 5. Flow cytometric characterization of endometrial NK cell populations. Expression of CD16 and CD56 surface Ags on endometrial leukocytes is shown for a fertile control (A) and a recurrent aborter (B).

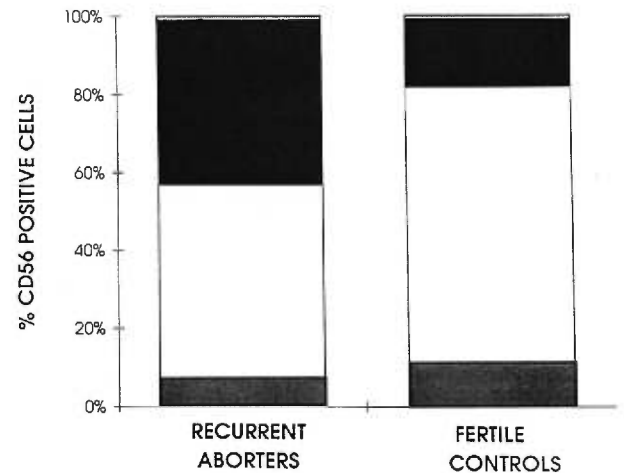


FIGURE 6. Distribution of NK cell subsets. NK cells from recurrent aborters and controls were plotted according to their combined pattern of expression of CD16 and intensity of CD56 fluorescence (CD16⁻CD56^{dim} (gray), CD16⁻CD56^{bright} (white), CD16⁻CD56^{dim} (black), and CD16⁺CD56^{bright} (stippled)).

nated upon the basis of individual endometrial lymphocyte populations, their original immunophenotypic characteristics were compared with those of patients not conceiving or with continuing abortions (Fig. 8). It can be seen that the aborters with successful pregnancies had a CD4⁺:CD8⁺ ratio < 1 , which is much lower

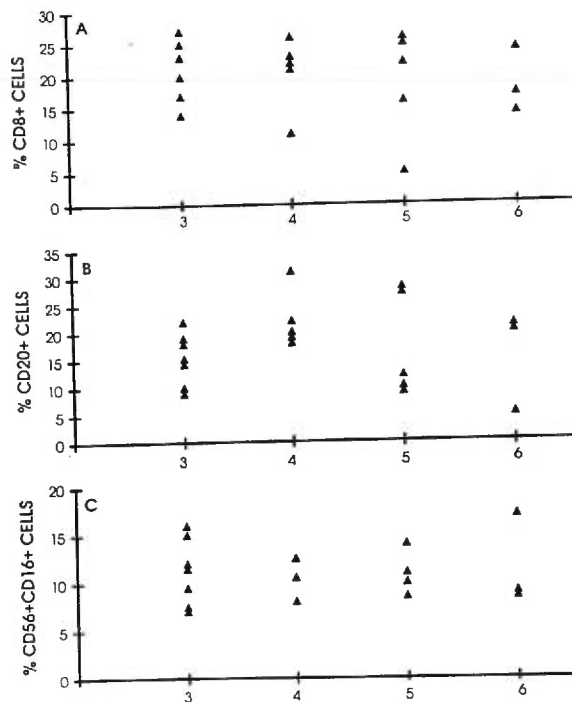


FIGURE 7. Impact of the number of abortions on lymphoid populations. In the recurrent aborter group the percentages of CD8⁺ cells (A), CD20⁺ cells (B), and CD56⁺CD16⁺ cells were determined according to the number of previous abortions.

than that in persistent recurrent aborters ($p < 0.05$), and equal to the control group ($p = \text{NS}$). Similarly, continued repetitive aborters had $19 \pm 3\%$ CD8⁺ cells, a significantly lower number than the $23 \pm 3\%$ CD8⁺ cells measured in repetitive aborters with durable pregnancies and the $25 \pm 3\%$ documented in normals (both $p < 0.05$) (data not shown). Also, the proportion of B cells in the recurrent aborters who had maintained an intact conceptus for extended periods was much lower than in patients with continued abortions ($p < 0.05$) and was similar to that of the fertile control group. Interestingly, no women with recurrent abortion had a normal immunophenotype, and all had an altered proportion of at least one of CD8⁺, CD20⁺, and/or CD56⁺CD16⁺ lymphoid subsets. However, pregnancy outcome could not be predicted by measuring populations of CD3⁺, CD4⁺, CD14⁺, and CD56⁺CD16⁺ lymphoid subsets (data not shown).

Discussion

Immunologic mechanisms have been postulated to explain recurrent abortions; however, few data are available to clearly define such entities, particularly in humans. Because no gross systemic immunosuppression is detectable in the mother, the potential exists for immune rejection of the fetus by the mother (28). It is generally accepted that a successful fetal allograft must depend on preventing a potentially harmful maternal immune response by local uteroplacental immunosuppression (29–31). Previous studies have shown that during normal gestation, human decidual lymphocytes are able to suppress the proliferative response of their PBLs to Con A (32). In addition, production of IL-4, IL-5, and IL-10 from the fetoplacental units in all three trimesters of gestation suggests a Th2-type maternal cytokine response during pregnancy (33). In this regard, Hill et al. (34) recently reported that women with un-

explained recurrent abortions had embryotoxic activity and Th1-type cytokines in trophoblast-activated lymphocyte supernatants, while the Th2-type cytokine IL-10 was detected in reproductively normal women. Moreover, immunocytochemical evaluation of murine decidua demonstrated lower numbers of suppressor T cells in spontaneous aborters, and treatment with anti-CD8 mAb resulted in enhanced abortion frequency (14). Furthermore, depletion of CD8⁺ cells not only increased spontaneous abortions but abrogated protection by cytokines (35). Altogether, these findings show that normal circulating lymphocytes generate "suppressor" cytokines in reaction to the trophoblast, an activity which seems decreased and associated with embryotoxicity in recurrent aborters. Also, murine decidual CD8⁺ lymphocytes are involved both directly and indirectly in the prevention of spontaneous abortions. Nevertheless, the exact nature of these effector cells in humans remains unclear.

In this study, we determined the proportion of immune cells, including CD8⁺ lymphocytes, in the endometrium of human recurrent aborters to determine whether their distribution was altered before induction of pregnancy. Flow cytometric analysis showed a decreased proportion of CD8⁺ cells in recurrent aborters. In addition, the CD4:CD8 ratio was significantly increased in recurrent aborters with values above 1 for patients, in comparison with ratios below 1 for most fertile controls. These results are further strengthened by the fact that patients with subsequent successful pregnancies had normal numbers of CD8⁺ cells and CD4:CD8 ratios. The lower number of CD8⁺ cells in the endometrium of recurrent aborters suggests that suppressor T cells might play a role preventing the maternal immune system from rejecting the conceptus and that the presence of these cells is important even before the induction of pregnancy. Indeed, in contrast to most previous reports, samples evaluated in this study consisted of secretory phase endometrium obtained from nonpregnant subjects, rather than decidua. Although, implantation cannot be totally ruled out, it is extremely unlikely to have occurred in a majority of samples because nonpregnancy was always confirmed by menstrual history, physical examination, and histologic evaluation. The fact that all the modifications in immunologic cell populations observed in habitual aborters, including decreased CD8⁺ T cells, increased CD20⁺ B cells, and altered NK cell subsets, were documented in nonpregnant endometrium shows that the implantation or infiltration of fetal cells is not mandatory to generate this distribution of immune cells. This altered distribution of endometrial cells could be the result of an aberrant response to prior immune stimulation by the semiallogeneic conceptus; yet once initiated, regulation of endometrial lymphocytes would seem to be persistently modified in patients presenting recurrent abortions.

The study of endometrial B lymphocytes has been hampered by the fact that they usually represent only a small fraction of stromal cells (23–25). However, flow cytometry, which facilitates the study of small cell populations (18), enabled us to assess the proportion of B cells in endometrial tissue. We found that habitual aborters had a dramatically increased percentage of endometrial B cells, which was more than threefold higher than the normal control value. Furthermore, five recurrent aborters had live births or a term pregnancy, and all these patients had normal B cell levels. In contrast, patients without pregnancy or presenting additional abortions had a higher proportion of B cells. Taken together, these results suggest that lower numbers of endometrial B cells before fertilization enable sustained pregnancy in both recurrent aborters and normals and that B cells could play an active role in the abortion process. Indeed, several humoral immune dysregulation models have been proposed to explain recurrent abortions (36). It is

Table II. *Clinical outcome*

	No. of Patients (%)		
	Primary aborters	Secondary aborters	Total aborters
Patients evaluable	11	9	20
No pregnancy	7 (64)	4 (44)	11 (55)
Additional abortions	1 (9)	3 (33)	4 (20)
	1 patient: 1 abortion	2 patients: 1 abortion 1 patient: 2 abortions	3 patients: 1 abortion 1 patient: 2 abortions
Sustained pregnancy (>36 wk)	1 (9)	0 (0)	1 (5)
Live births	2 (18)	2 (22)	4 (20)

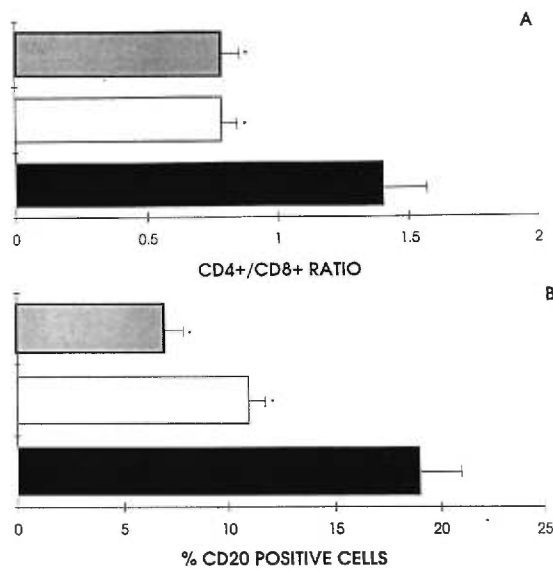


FIGURE 8. Immunophenotype of recurrent aborters with or without viable pregnancy. Recurrent aborters were prospectively evaluated following endometrial sampling. CD4⁺:CD8⁺ ratios (A) and percentage of CD20⁺ cells (B) (mean \pm SD) were measured in patients who had a successful pregnancy (white) ($n = 5$), and compared with patients who remained repetitive aborters (black) ($n = 15$) and to normal controls (gray) ($n = 15$). CD4⁺:CD8⁺ ratios and CD20⁺ cells were both lower in patients with a successful pregnancy and controls than in patients who remained repetitive aborters ($p < 0.05$). There was no significant difference between the first two groups of subjects.

tempting to speculate that these B cells are involved in the generation of plasmacytes responsible for the secretion of Abs directed against vital parts of the fetoplacental unit. They could also be involved in Ag presentation and the initiation of the cascade of immunologic events leading to fetal demise. These findings provide further evidence in support of a contribution of B cells to idiopathic abortions. In future studies, it will be important to determine whether their expansion is monoclonal or polyclonal and to investigate the role of such B cells in maintaining a viable conceptus.

The contribution of NK cells to fetal engraftment has been a controversial issue. Indeed, several studies suggest that NK cells are a prerequisite for maintaining pregnancy (23, 25), while others suggest that NK cells display deleterious effects on fetal development, resulting in spontaneous abortion in mice (11, 15, 16) or humans (10, 37–39). In this study, recurrent aborters had the same proportion of endometrial NK cells as fertile controls. However, NK cells are phenotypically and functionally heterogeneous cells, particularly with respect to CD16, the receptor for Fc portion of

IgG (Fc γ III) (26). Indeed, the great majority of peripheral blood NK cells are CD16⁺, while only 20 to 30% of human decidual NK cells express CD16 (21, 23, 40, 41). Also, we recently reported that NK cells in human nonpregnant endometrium primarily harbor the unusual CD16⁻CD56^{bright} phenotype (18). When we evaluated CD16 expression on endometrial NK cells from recurrent aborters, we found an increased proportion of CD16⁺CD56⁺ cells. Although the percentage of CD56^{dim} cells was identical in both groups of subjects, the CD16⁺CD56^{dim} population was increased in recurrent aborters. As CD16 triggers NK cell Ab-dependent cellular cytotoxicity and CD16⁺ NK cells consistently exhibit higher cytolytic activity than CD16⁻ NK cells (26, 27), this increased proportion of CD16⁺CD56^{dim} cells may thus be involved in the demise of the conceptus, either directly or indirectly when exposed to Ab-coated fetal-derived cells. Alternately, CD16⁻CD56^{bright} NK cells have been shown to secrete various cytokines, including macrophage-CSF and granulocyte-macrophage-CSF, which are thought to promote placental growth (27, 42, 43). The decrease in CD16⁻CD56^{bright} NK cells observed in recurrent aborters may therefore be associated with an altered cytokine expression profile, and with failure to provide the conceptus with the proper growth environment. Thus, we propose that the dual roles of NK cells toward the conceptus in promoting or inhibiting its growth could be ascribed to two different NK cell subsets differentially expressing CD16 and skewed toward either cytokine secretion or cytotoxicity. Also, repetitive abortion could be attributed to an imbalance between CD16⁺CD56^{dim} and CD16⁻CD56^{bright} cells.

In this study, some of the patients with recurrent abortions were finally able to deliver or remain pregnant for at least 36 wk. Interestingly, these patients had proportions of CD8⁺ and CD20⁺, and CD4⁺:CD8⁺ ratios similar to those found in the fertile control group. This finding reinforces the importance of these cell populations in the pathophysiology of recurring abortions. It also suggests that recurrent aborters consist of a heterogeneous group of patients with different prognoses and most likely different etiologies. Thus, it may be possible to use these phenotypic results to discriminate between patients with a high or low probability of subsequent sustained pregnancy. The fact that NK cell populations of patients with prolonged pregnancies were the same as those found in continuing aborters suggests that NK cells may have less of a determinant effect on pregnancy outcome than CD8⁺ T cells or B cells. Interestingly, abortion-prone mating combinations stimulate production of TNF- α , IFN- γ , and IL-2 in mixed lymphocyte-placenta reaction (44). In this setting, trophoblast cells, which are normally resistant to lysis by NK cells (45, 46), could be eliminated by NK cells activated following exposure to TNF- α and IL-2 (47). Moreover, the concentration of IL-2 needed to activate decidual NK cells is well within the realm of levels reached in tissues; and once activated, NK cytotoxicity cannot be suppressed by TGF- β 2 (20). Therefore, differences in NK cell subsets identified

in our study in all recurrent aborters could be necessary, but not sufficient, to generate a subsequent abortion. The presence of high numbers of Ag-presenting B cells and of decreased numbers of CD8⁺ suppressor T cells (48) would bear the weight of an increased production of cytokines, such as TNF- α , IFN- γ , and IL-2, resulting in NK cell activation, which, in turn, would explain the continuous fetal loss process observed.

At present, few laboratory tests are available to investigate populations who may have immunologically mediated abortions. Various indicators of immune function have been used, such as measures of mixed lymphocyte reactivity (49), blocking Abs (50), development of anti-paternal Abs (51), and terminal labeling assays (10). All these approaches are most useful for the study of pathophysiologic processes leading to fetal demise, but such tests are difficult to perform on a routine basis. Flow cytometry is widely used and accessible in the clinic. Methods to isolate endometrial leukocytes are simple, and labeling and flow cytometric analysis are easily amenable to standardization. Flow cytometric evaluation of endometrial leukocytes could help identify the role of various cell subsets and classify habitual aborters according to their immunophenotypic profile. Thus, it has the potential to become an important tool in the evaluation of immune mechanisms involved in these patients.

In conclusion, our results support the hypothesis that maternal immunologic assault against the placental cells could give rise to repeated fetal loss at an early stage of pregnancy in women with habitual abortion. The distinct immunophenotypic profile of leukocytes observed in nonpregnant endometrium suggests that a hostile "terrain" may be responsible for fetal loss. Moreover, this reaction seems to involve a complex network of effector cell populations. Whether these data are generalizable to all patients with idiopathic recurrent abortions must still be addressed. In future studies, it will be useful to further investigate the cytotoxic activity of endometrial leukocytes and define the immunologic mechanisms that either suppress or promote implantation and fetal development. Moreover, it will be interesting to better define the conditions leading to sustained tolerance toward trophoblastic cells.

Acknowledgments

The authors thank the obstetricians-gynecologists and nurses of Maisonneuve-Rosemont Hospital and Institut de Médecine de la Reproduction de Montréal for their help in providing endometrial tissue for this study. Also, the authors are grateful to Anick Hébert for her excellent technical assistance and to Dr. Claude Perreault for critical reading of the manuscript.

References

- Coulam, C. B., and D. A. Clark. 1991. Report from the ethics committee for immunotherapy, American Society for the Immunology of Reproduction. *Am. J. Reprod. Immunol.* 26:93.
- Diedrich, U., I. Hansmann, D. Janke, O. Opitz, and H. D. Probeck. 1983. Chromosome anomalies in 136 couples with a history of recurrent abortions. *Hum. Genet.* 65:48.
- Hill, J. A., and V. A. Raviniker. 1990. Recurrent abortion. In *Gynecology: Principles and Practice*. K. J. Ryan, ed. Year Book, New York, p. 406.
- Stray-Pederson, B., and S. Stray-Pederson. 1984. Etiologic factors and subsequent reproductive performance in 195 couples with a prior history of habitual abortion. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 148:140.
- Hill, J. A., F. Haimovici, and D. J. Anderson. 1987. Products of activated lymphocytes and macrophages inhibit mouse embryo development in vitro. *J. Immunol.* 139:2250.
- Carp, H. J. A., V. Toder, E. Gazit, S. Orgad, S. Mashiach, D. M. Serr, and L. Nebel. 1988. Paternal leucocyte immunization and habitual abortion. *Contemp. Rev. Obstet. Gynaecol.* 1:49.
- Hill, J. A., K. Polgar, B. L. Harlow, and D. J. Anderson. 1992. Evidence of embryo- and trophoblast-toxic cellular immune response(s) in women with recurrent spontaneous abortion. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 166:1044.
- Stern, J. J., and C. B. Coulam. 1993. Current status of immunologic recurrent pregnancy loss. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 5:252.
- Bulmer, J. N. 1989. Decidual cellular responses. *Curr. Opin. Immunol.* 1:1141.
- Yokoyama, M., M. Sano, K. Sonoda, M. Nozaki, G. I. Nakamura, and H. Nakano. 1994. Cytotoxic cells directed against placental cells detected in human habitual abortions by an in vitro terminal labeling assay. *Am. J. Reprod. Immunol.* 31:197.
- Gendron, R. L., and M. G. Baines. 1988. Infiltrating decidual natural killer cells are associated with spontaneous abortion in mice. *Cell. Immunol.* 113:261.
- Duclos, A. J., E. K. Haddad, and M. G. Baines. 1995. Presence of activated macrophages in a murine model of early embryo loss. *Am. J. Reprod. Immunol.* 33:354.
- Crepeau, M. A., and B. A. Croy. 1988. Evidence that specific cellular immunity cannot account for death of *Mus caroli* embryos transferred to *Mus musculus* with severe combined deficiency disease. *Transplantation* 45:1104.
- Clark, D. A., J. Brierley, D. Banwatt, and G. Chaouat. 1989. Hormone-induced pre-implantation Lyt-2⁺ murine uterine suppressor cells persist after implantation and may reduce the spontaneous abortion rate in CBA/J mice. *Cell. Immunol.* 123:334.
- Clark, D. A. 1994. Maternal aggression against placenta? *Am. J. Reprod. Immunol.* 31:205.
- Baines, M. G., and R. L. Gendron. 1990. Are both endogenous and exogenous factors involved in spontaneous foetal abortion? *Res. Immunol.* 141:154.
- Yamada, H., K. Polgar, and J. A. Hill. 1994. Cell-mediated immunity to trophoblast antigens in women with recurrent spontaneous abortion. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 170:1339.
- Lachapelle, M. H., P. Miron, R. Hemmings, C. Baron, and D. C. Roy. 1996. Flow-cytometric characterization of hematopoietic cells in non-pregnant human endometrium. *Am. J. Reprod. Immunol.* 35:5.
- Clark, D. A., G. Vince, K. C. Flanders, H. Hirte, P. Starkey. 1994. CD56^{bright} lymphoid cells in human first trimester pregnancy decidua as a source of novel transforming growth factor- β -related immunosuppressive factors. *Hum. Reprod.* 9:2270.
- Saito, S., T. Morii, M. Enomoto, S. Sakakura, K. Nishikawa, N. Narita, and M. Ichijo. 1993. The effect of interleukin 2 and transforming growth factor- β (TGF- β) on the proliferation and natural killer activity of decidual CD16-CD56^{bright} natural killer cells. *Cell. Immunol.* 152:605.
- Starkey, P. M., I. L. Sargent, and C. W. G. Redman. 1988. Cell populations in human early pregnancy decidua: characterization and isolation of large granular lymphocytes by flow cytometry. *Immunology* 65:129.
- Maruyama, T., T. Makino, T. Sugi, H. Matsubayashi, N. Ozawa, and S. Nozawa. 1992. Flow-cytometric analysis of immune cell populations in human decidua from various types of first-trimester pregnancy. *Hum. Immunol.* 34:212.
- King, A., V. Wellings, L. Gardner, and Y. W. Loke. 1989. Immunocytochemical characterization of the unusual large granular lymphocytes in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum. Immunol.* 24:195.
- Kamat, B. R., and P. G. Isaacson. 1987. The immunocytochemical distribution of leukocytic subpopulations in human endometrium. *Am. J. Pathol.* 127:66.
- Bulmer, J. N., P. M. Johnson, and D. Bulmer. 1987. Leucocyte populations in human decidua and endometrium. In *Immunoregulation and Fetal Survival*. T. J. Gill, and T. G. Wegmann, eds. Oxford University Press, Oxford, U.K., p. 111.
- Nagler, A., L. L. Lanier, S. Cwirla, and J. H. Phillips. 1989. Comparative studies of human FCRIII-positive and negative natural killer cells. *J. Immunol.* 143:3183.
- Robertson, M. J., and J. Ritz. 1990. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 76:2421.
- Johnson, P. M. 1993. Immunobiology of the human placental trophoblast. *Exp. Clin. Immunogenet.* 10:118.
- Zigril, M., A. Fein, H. Carp, and V. Toder. 1991. Immunopotentiality reverses the embryotoxic effect of serum from women with pregnancy loss. *Fertil. Steril.* 56:653.
- Daya, S., K. L. Rosenthal, and D. A. Clark. 1987. Inmunosuppression factor(s) produced by decidua-associated suppressor cells: a proposed mechanism for fetal allograft survival. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 156:344.
- Clark, D. A., R. Slapsys, B. A. Croy, J. Kreck, and J. Rossant. 1984. Local active suppression by suppressor cells in the decidua: a review. *Am. J. Reprod. Immunol.* 5:78.
- Daya, S., D. A. Clark, C. Devlin, J. Jarrell, and A. Chaput. 1985. Suppressor cells in human decidua. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 151:267.
- Lin, H., T. R. Mosmann, L. Gilbert, S. Tuntipopipit, and T. G. Wegman. 1993. Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *J. Immunol.* 151:4562.
- Hill, J. A., K. Polgar, and D. J. Anderson. 1995. T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion. *JAMA* 273:1933.
- Clark, D. A., G. Chaouat, R. Nogel, and T. G. Wegman. 1994. Prevention of spontaneous abortion in DBA/2-mated CBA/J mice by GM-CSF involves CD8⁺ T cell-dependent suppression of natural effector cell cytotoxicity against trophoblast target cells. *Cell. Immunol.* 154:143.
- Clark, D. A. 1992. Controversies in reproductive immunology. *Crit. Rev. Immunol.* 11:215.
- Coulam, C. B., R. G. Goodman, E. J. Thomason, and K. D. Beaman. 1995. Systemic CD56⁺ cells can predict pregnancy outcome. *Am. J. Reprod. Immunol.* 33:40.
- Makida, R., M. Minami, M. Takamizawa, T. Juji, T. Fujii, and M. Mizuno. 1991. Natural killer cell activity and immunotherapy for recurrent spontaneous abortion. *Lancet* 338:579.
- Aoki, K., S. Kajitara, Y. Matsumoto, M. Ogasawara, S. Okada, Y. Yagami, and N. Gleicher. 1995. Preconceptional natural-killer-cell activity as a predictor of miscarriage. *Lancet* 345:1340.
- Ritson, A., and J. N. Bulmer. 1987. Endometrial granulocytes in human decidua react with a natural-killer (NK) cell marker. *Immunology* 62:329.

41. Sato, S., H. Kanzaki, M. Yoshida, M. Tokushige, H. S. Wang, M. Kariya, N. Okamoto, Y. Kariya, A. Uchida, S. Kasakura, and T. Mori. 1990. Studies on T-lineage cells in human decidua of first trimester pregnancies. *Am. J. Reprod. Immunol.* 24:67.
42. Wegmann, T. G. 1988. Maternal T cells promote placental growth and prevents spontaneous abortion. *Immunol. Lett.* 17:297.
43. Saito, S., K. Niskawa, T. Morii, M. Emonoto, N. Narita, K. Motoyoshi, and M. Ichijo. 1993. Cytokine production by CD16⁻CD56^{bright} natural killer cells in the human early pregnancy decidua. *Int. Immunol.* 5:559.
44. Tangri, S., T. G. Wegman, H. Lin, and R. Raghupathy. 1994. Maternal anti-placental reactivity in natural immunologically mediated fetal resorptions. *J. Immunol.* 152:4903.
45. Drake, B. L., and J. R. Head. 1989. Murine trophoblast cells can be killed by lymphokine activated killer (LAK) cells. *J. Immunol.* 143:9.
46. Zuckerman, F. A., and J. R. Head. 1988. Murine trophoblast resist cell mediated lysis. II. Resistance to natural cell mediated cytotoxicity. *Cell. Immunol.* 116:274.
47. Clark, D. A., R. G. Lea, T. Poder, S. Daya, D. Banwatt, and C. Harley. 1990. Cytokines determining the success and failure of pregnancy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 626:524.
48. Lea, R. G., J. Underwood, K. C. Flanders, H. Hirte, D. Banwatt, S. Finotto, I. Ohno, S. Daya, C. Harley, M. Michel, J. F. Mowbray, and D. A. Clark. 1995. A subset of patients with recurrent spontaneous abortion is deficient in transforming growth factor β -2 producing "suppressor cells" in uterine tissue near the placental attachment site. *Am. J. Reprod. Immunol.* 34:52.
49. Beer, A. E. 1988. Immunologic aspects of normal pregnancy and recurrent spontaneous abortion. *Semin. Reprod. Endocrinol.* 6:163.
50. Unander, A. M., and A. Lindholm. 1986. Transfusions of leukocyte rich erythrocyte "concentrates": a successful treatment in selected cases of habitual abortion. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 154:516.
51. Mowbray, J. F., J. L. Underwood, M. Michel, P. B. Forbes, and R. W. Beard. 1987. Immunization with paternal lymphocytes in women with recurrent miscarriage. *Lancet* 2:679.

DIFFERENTIAL INVOLVEMENT OF ENDOMETRIAL LYMPHOCYTES IN INFERTILE PATIENTS WITH ENDOMETRIOSIS.

M-H Lachapelle^{1,2}, P. Miron^{1,2}, D.C. Roy^{1,3}.

¹Montreal Institute for Reproductive Medicine, ²Department of Obstetrics-Gynecology and ³Division of Immunology-Hematology, Department of Medicine, Maisonneuve-Rosemont Hospital and Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Submitted to JAMA

Reprint requests: Denis-Claude Roy
Departments of Immunology-Hematology
Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center
5415 l'Assomption Blvd, Montreal
Québec, Canada, H1T 2M4
Tel: (514) 252-3400
Fax: (514) 252-3569

RUNNING TITLE: Endometrial lymphocytes with and without endometriosis.

Supported by a grant from the Montreal Institute for Reproductive Medicine. D.C.R. is a scholar of the Fonds de Recherche en Santé du Québec.

ABSTRACT:

Principal etiologies of female infertility in the context of intact ovarian function include endometriosis, tubal factors and unexplained infertility. In these disorders the pathophysiology of infertility is yet unclear and associated immune dysregulation has been postulated. As the endometrium is the primary site of contact with the fertilized egg, the aim of this study was to evaluate the immune cell populations present in the endometrium of patients within principal categories of infertility. For this purpose, we have studied the immunophenotypic characteristics of leukocyte populations present in the endometrium of infertile women and compared them with those of normal women. Flow-cytometric evaluation of endometrial leukocytes was performed in 122 infertile patients: 52 with endometriosis, 20 with tubal factor, and 50 with unexplained infertility; and 15 fertile controls. Women with endometriosis had a decreased proportion of endometrial T (CD3+) lymphocytes, while NK cells (CD56+), particularly those with the CD56+CD16- phenotype, and B lymphocytes (CD20+) were significantly increased ($p < 0.05$). Patients with tubal factors also had a significantly decreased T-cell population and an increased proportion of NK cells, but no changes in CD20+ cells. In contrast, patients with unexplained infertility had a normal leukocyte subset distribution. Patients with a ratio of CD56+/CD3+ cells in their endometrium above 1.2, had a very high likelihood of endometriosis ($p < 0.005$). In fact, the CD56/CD3 ratio was above 1.2 in 42% of patients with endometriosis and importantly the specificity of this ratio reached 81%. Impressively, this parameter alone was extremely specific (97%) for identifying patients with endometriosis and/or tubal factors. In contrast, neither infertility category was associated with detectable alterations in circulating cells. In conclusion, our results show that the immunophenotypic distribution of endometrial

leukocytes is a non-invasive approach that can be used to distinguish specific categories of infertility such as endometriosis. In addition, these findings suggest distinct mechanistic pathways for the immunologic pathogenesis of infertility in endometriosis and even tubal factors.

INTRODUCTION:

Approximately 10% to 15% of couples attempting pregnancy are infertile (Wah, 1990). Common etiologies of female infertility include cervical, tubal, and ovarian factors, immunologic disorders and endometriosis (Hull, 1987). However, in the case of endometriosis, its the exact contribution to infertility, in the absence of additional factors, remains unclear.

While ovulation disorders can usually be readily identified through collection of clinical and laboratory data, other causes of infertility are more difficult to diagnose; and pathophysiologic mechanisms more obscure. Tubal and uterine factors can often be excluded by performing an hysterosalpingogram. Potential immunologic disorders are investigated by measuring anti-phospholipid antibodies, and identifying HLA antigens of both partners (Healy, 1994). In instances where the cause of infertility cannot be defined, a laparoscopy is usually performed. Ultimately, if such procedures are of no avail in establishing a diagnosis, the condition is referred to as unexplained infertility. Unfortunately, even after laparoscopy, the majority of patients are assigned to the latter category.

Over the last ten years, majors efforts were generated to better define the contribution of immunologic factors to infertility and to develop non-invasive diagnostic tests. Anti-phospholipid antibodies (Mosher, 1987; Gleicher, 1988; Triplett, 1988) and, autologous and allogeneic anti-sperm antibodies (Coulam, 1992; Gleicher, 1988; Bronson, 1984, Haas, 1980) were among the principal humoral immune abnormalities clearly associated with infertility. The identification of inappropriate allogeneic immune responses to the fertilized

egg introduced the notion of cellular immune maternal effector mechanisms (Coulam, 1988). Similarly, Wah et al. (1990) found an association between asymptomatic cervicovaginal leukocytosis and infertility. Increased numbers of mononuclear cells and cytokines that could interfere with fertility were also found in the peritoneal and tubal as well as follicular fluids of patients with endometriosis and unexplained infertility (Hill, 1988; Haney, 1983; Lachapelle, 1996). In addition, several studies identified anti-sperm cell-mediated immune responses in infertile women (McShane, 1985; Marcus, 1973; Mettler, 1975; Soffer, 1976). Moreover, a large number of endometrial T cell populations in infertile patients were found to be activated T-cells (Xu, 1987). The possibility of an immune maternal reaction against paternal antigens has even prompted the initiation of clinical studies where paternal lymphocytes are infused to try to abrogate this response in patients with unexplained infertility (Iddekinge, 1993; Maruyama, 1993; McIntyre, 1986; Jeannet, 1985).

Cells with immune potential are particularly abundant in the uterine cavity, which is the most important site of contact between fetal and maternal cells. In this context, we postulated that endometrial monocytes and lymphocyte subsets would be altered in infertile patients, and could help distinguish different disease categories and their underlying pathophysiologic processes. In this study, we evaluated the nature of leukocytes and lymphocyte populations present in the endometrium of 122 infertile women, and studied the relationship between the distribution of immune cells and diagnostic category of infertility. In addition, we determined whether this non-invasive approach could help stratify patients according to diagnosis prior to performing laparoscopy. Finally, we investigated the potential of specific cell populations in peripheral blood to reflect immunologic patterns detected in the endometrium of these patients.

MATERIALS AND METHODS:

Patient population: All 122 subjects evaluated in this study presented with infertility problems. They all underwent an extensive evaluation that included menstrual history, basal temperature records, luteal phase endometrial biopsy, serum and urine hormone level measurement, anti-phospholipid and anti-sperm antibodies detection, hysterosalpingogram and laparoscopy. These women took no medication and the duration of infertility was of at least 2 years. Subjects with male infertility as well as cervical and ovarian factors were excluded. Fifty-two (52) infertile patients had endometriosis as only cause for infertility. The presence and severity of the disease was ascertained during laparoscopy and staging performed according to the revised American Fertility Society classification (rAFS, 1985): stage I (22 patients); stage II (13 patients); stage III (9 patients); and stage IV (8 patients). Seventy (70) infertile patients without endometriosis were also included: 20 patients had tubal factors and the other 50 had unexplained infertility, as defined by infertility without a discernible cause after an extensive evaluation. The normal control group consisted of 15 healthy fertile women who underwent tubal ligation or anastomosis, and were found without pelvic pathology. The immunophenotypic characteristics of these patients' endometrial leukocytes were previously reported (Lachapelle, 1996).

Tissue Samples: Tissue samples were obtained with the informed consent of the patients under protocols approved by the Human Subjects Protection Committee of the Maisonneuve-Rosemont Hospital. Endometrial samples were collected with a Wallach endometrial sampler (Wallack Surgical devices, Nilford, CT) and placed into sterile RPMI-1640 medium (Gibco, Grand Island, NY) supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco),

2% L-glutamine and 1% penicillin-streptomycin. All biopsies were taken during the secretory phase of the menstrual cycle (between the day 18 to 25) as confirmed by pathological examination. Blood samples were collected in preservative-free heparin and mononuclear cells (MC) obtained after Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation.

Cell Isolation: Endometrial leukocytes were isolated according to a previously described methodology (Lachapelle, 1996). Briefly, samples were first mechanically disrupted with a round shape pestle tissue grinder (Fisher, Fair Lawn, NJ). The cell suspension was then filtered through a 250 μ M stainless steel sieve (Milipore, Bedford, MA) to remove glandular tissue and obtain a leukocyte-enriched fraction for flow-cytometric evaluation.

Antibody Labelling and Flow-Cytometry: The following monoclonal antibodies (mAbs) directly conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) or phycoerythrin (PE) were used to analyse the surface antigens of endometrial leukocytes and peripheral blood MC: anti-CD3 (T3-FITC), anti-CD4 (T4-PE), anti-CD8 (T8-FITC), anti-CD14 (MO2-FITC), anti-CD20 (B1-FITC), anti-CD56 (NKH1-PE) (Coulter Immunology, Hialeah, FL), anti-CD16 (leu-11a-FITC) and anti-CD45 (LCA-FITC) (Becton-Dickinson, San Jose, CA). Labelling of cells with this panel of monoclonal antibodies was performed using standard techniques (Lachapelle, 1996; Roy, 1995). Briefly, 0.5×10^6 cells were incubated with mAbs for 30 minutes at 4°C, washed twice and filtered on a 40 μ M nylon sieve. Prior to analysis, propidium iodine (1 μ g/mL) (Sigma, St-Louis, MO) was added to these unfixed cells, in order to exclude dead cells and debris. Less than 10% of cells were positively stained with PI. Immunofluorescence reactivity was determined by flow-cytometry (FACStar PLUS, Becton-Dickinson, San Jose, CA) analysing 10^4 cells in each sample.

Statistical Analysis: Statistical significance between the experimental and control groups was determined using a variance analysis and a Tuckey's test using the SAS software. The specificity and sensitivity of the parameters were evaluated with the SPSS software. The level for a statistically significant difference was set at $p < 0.05$.

RESULTS:

Patient Characteristics: Subjects evaluated in this study all presented with infertility, they all underwent complete evaluations and no underlying causes could be detected. These patients then had a diagnostic laparoscopy. After laparoscopic examination, the final diagnosis was endometriosis in 43% of patients (52 patients), a tubal abnormality in 16% of patients (20 patients), while 41% remained with unexplained infertility. Flow-cytometric analysis were performed on endometrial tissue samples obtained at or before laparoscopy, during the luteal phase for all these patients and evaluated by flow-cytometry to determine endometrial leukocyte populations. Each group was evaluated in terms of patient age, parity and time of endometrial sampling (Table I). No significant differences were observed between each group, except for gravidity and parity which were higher in the control group ($p<0.05$).

Endometrial Leukocyte Populations: The immunophenotypic characteristics of endometrial leukocytes were determined using two-color flow-cytometric analysis. In all patient groups, endometrial leukocytes, as defined by CD45 expression, represented the great majority of cells evaluated in patients with endometriosis ($78\pm 10\%$; mean \pm SD), with tubal factor and unexplained infertility (81 ± 6) and in normal controls ($79\pm 5\%$). Endometrial leukocyte populations were divided into T (CD3, CD4, CD8) and B (CD20) lymphocytes, NK cells (CD56) and monocytes/macrophages (CD14) (Figure 1). The distribution of populations was evaluated by variance analysis and found to represent normal distributions (data not shown). Thymocytes (CD3⁺) represented $35\pm 11\%$ of endometrial leukocytes (Figure 1A) in patients with endometriosis and $29\pm 7\%$ in tubal factor infertile patients. The

percentage of CD3⁺ cells was lower in these 2 groups of patients than in those with unexplained infertility (42±6%) and normal controls (41±10%) ($p<0.05$) (Tuckey's test). When T cells were subdivided into helper-inducer (CD4⁺) (Figure 1D) and suppressor-cytotoxic (CD8⁺) (Figure 1E) T cells, percentages were again lower in patients with endometriosis and tubal factor yet these differences did not reach statistical significance. The proportion of endometrial NK cells (CD56⁺) was significantly increased in patients with endometriosis (41±13%) when compared to controls (27±5%) and to unexplained infertile patients (27±4%) ($p<0.05$) (Figure 1B). Interestingly, in patients with tubal factor infertility NK cells were increased to levels observed in endometriosis (40±6%) ($p<0.05$). As shown in Figure 1C, the proportion of B lymphocytes (CD20⁺) was increased in the endometrium of subjects with endometriosis with 14±9% CD20⁺ cells, a number almost 3 times that of normal controls ($p<0.05$). The number of monocytes/macrophages (CD14⁺) were comparable in all groups (Figure 1F).

Parameters to identified disease categories: As patients with endometriosis and tubal factor demonstrated proportions of T, NK and/or B cells that differed from those in unexplained infertility and even normal controls, we evaluated their potential to predict disease category. As shown in table II, a low percentage of endometrial CD3⁺ cells was moderately sensitive (61%) and specific (63%) for endometriosis. High percentage of CD56⁺ and CD20⁺ cells were less sensitive (42-47%) but more specific (83-84%) of this diagnosis.

In individual patients with endometriosis, we also noted that the percentage of NK (CD56⁺) and T cells (CD3⁺) seemed to vary in opposite directions. Therefore, we evaluated the

possibility that patients with endometriosis had an altered CD56/CD3 ratio. We found that patients with endometriosis had an increased CD56/CD3 ratio ($p < 0.005$) (Figure 2A). In fact, a CD56/CD3 ratio above 1.2, had a sensitivity of 40%, and a specificity of 81% for detection of endometriosis (Table II). Interestingly, the great majority of patients in the tubal factor group also demonstrated a CD56/CD3 ratio greater than 1.2. When this ratio was evaluated to predict for endometriosis and/or tubal factor, its increased to a sensitivity of 48% and to specificity of 97%. Interestingly, when we evaluated the etiology of tubal factor infertility in order to determine its impact on immune cell distributions, we found that almost all tubal factor patients with a history of pelvic inflammatory disease (PID) had a CD56/CD3 ratio below 1.2, while those without known etiologic factors corresponded to those with an increased CD56/CD3 ratio. Moreover, among patients with an elevated CD56/CD3 ratio, those with tubal factor had a lower percentage of CD20 + cells enabling discrimination from normal controls and patients with unexplained infertility; and leading to the identification of a population with a very high likelihood of endometriosis (high CD56/CD3 ratio and elevated CD20+ cells)(Figure 2B).

Endometrial Leukocytes in infertile patients with endometriosis: To determine whether the severity of endometriosis could influence the immunophenotypic profile of endometrial leukocytes, we compared the proportion of CD3+, CD56+ and CD20+ cells according to the stage of endometriosis. As shown in figure 3A, the proportion of CD3+ cells was lowest in patients with stage I endometriosis, and the percentage of these cells increased gradually with increasing stage of disease. The level of CD3+ cells was highest in patients with stage IV disease, reaching values of the fertile control group. In contrast, NK and B cell percentages were similarly elevated at all stages of the disease (I to IV) (Figure 3B-C).

Moreover, a high CD56/CD3 ratio was maintained throughout the different stages of the disease (Figure 3D).

As pregnancy has been shown to favorably affect the clinical course of endometriosis, we also assessed whether patients who had a pregnancy prior to their infertility could be discriminated upon the basis of individual endometrial lymphocyte populations (Figure 4). Indeed, CD3⁺ cells in patients with endometriosis and previous pregnancy were higher than those without a previous pregnancy and identical to normal controls ($p < 0.05$). The former also had lower numbers of CD56⁺ cells than patients never pregnant, but with numbers that could still be discriminated from normal controls ($p < 0.05$).

Natural Killer Cell Subsets: Two-color flow-cytometry was performed to determine whether CD56⁺ cells represented NK cells or rather T cells expressing CD56. Infertile patients had an overwhelming majority of CD56⁺CD3⁻ endometrial NK cells, whether they had endometriosis ($81 \pm 6\%$) or not ($81 \pm 4\%$), with percentages identical to normal controls ($83 \pm 5\%$). In normal individuals, the majority of endometrial NK cells have been shown to harbor the unusual FcR γ III (CD16) negative phenotype (King, 1989; Kamat, 1993; Bulmer, 1987; Lachapelle, 1996). When we measured coexpression of CD16 on endometrial CD56⁺ cells from infertile patients, the majority of NK cells were FcR γ III negative (Figure 5) and CD56⁺CD16⁺ cells represented a minority of NK cells, with identical numbers in all patient groups. However, the percentage of CD56⁺CD16⁻ cells was higher in patients with endometriosis and tubal factor than in patients with unexplained infertility and controls.

Peripheral Blood Leukocytes: In order to determine if the different populations of endometrial leukocytes observed in distinct subsets of infertile patients reflected a systemic immunological imbalance, these leukocyte subsets were measured in peripheral blood. The concentration of peripheral blood mononuclear cells was identical in infertile patients with or without endometriosis, in patients with unexplained infertility and in normal healthy women (Figure 6). In addition, when results for endometriosis patients were subdivided according to the stage of the disease, there was no significant difference in any peripheral blood lymphocyte subset (data not shown).

DISCUSSION:

Cellular and humoral immune abnormalities have been reported at both systemic and local peritoneal levels in endometriosis (Kikuchi, 1993; Ota, 1993; Dmowski, 1981; Hill, 1992; Vigano, 1991; Gleicher, 1984; Halme, 1983; Haney, 1981). The endometrium of these patients has been shown to secrete more complement-3 than that of patients without endometriosis, and to harbor increased numbers of proliferating endometrial cells (Isaacson, 1990; Wingfield, 1995). In rhesus monkeys with spontaneous endometriosis, lower inflammatory and blastogenesis responses to endometrial antigens were observed (Rier, 1993). In addition, women with endometriosis had decreased peripheral blood and peritoneal NK cytotoxicity against autologous and heterologous endometrial cells (Oosterlynck, 1991; Vigano, 1991; Iwasak, 1993, Tanaka, 1992; Garzetti, 1993). These results suggest that an impairment in immune reactivity against ectopic endometrial cells allow their uncontrolled proliferation. As endometriotic lesions are usually thought to originate from retrograde menstrual flow (Hill, 1988), it seems likely that immune cells constitutively present in the endometrium would also be transported into the peritoneal cavity and be the first effector cells responsible for the elimination of endometriotic implants. However, in patients with endometriosis, this impairment in immunologic function should start with these cells and result in defective recognition and aberrantly located endometrial cells. Locally, in the endometrium, such immune dysregulation could also be implicated in the infertility process often associated with endometriosis. In fact, a pre-implantation immunologic rejection has been postulated to explain several infertile conditions, particularly unexplained infertility (Anderson, 1988). Nevertheless, the nature of

these immune cell populations present in the endometrium of infertile patients with and without endometriosis has not been investigated thoroughly.

In this study, endometrial lymphoid and monocyte subsets were analyzed in 122 patients with infertility, but intact ovarian function, in order to establish whether their contribution to the etiology of infertility and other clinical characteristics of the disease. Results presented in this study demonstrate that distinct endometrial lymphocyte profiles can be found in women with endometriosis, tubal factor and unexplained infertility, and that these profiles, provide important clues on the underlying pathogenic processes and could be used for early diagnosis.

In comparison to normal fertile women, individuals with endometriosis had a decreased proportion of endometrial T cells, with identical proportions of CD4+ and CD8+ cells. This deviant immunologic profile could also be involved in the infertility that has been documented with endometriosis, even in instances where mechanical factors are ruled out. This immunologic contribution is further strengthened by the most important differences in T cell percentages being observed in patients with the lowest stage of disease, where the likelihood of associated mechanical factors is less than in stage IV patients. Other studies have reported higher numbers of macrophages and inflammatory cytokines in the peritoneum of patients with stage I-II than stage III-IV disease (Braun,1992; Hill, 1988). Moreover, infertility is a more frequent complication of endometriosis in the former than the latter group (Hill, 1988). Thus, our observation of a more prominent decrease of disease, which also have a lower likelihood of mechanical damage, further strengthen the hypothesis of an immunologic contribution to infertility in endometriosis.

Decreased peripheral blood and peritoneal NK cytotoxicity to endometrial cells was reported in women with endometriosis and related to a defect in natural killer cells activity and to a partial resistance of endometrial cells to NK cytotoxicity (Garzetti, 1993; Iwasaki, 1993; Tanaka, 1992; Oosterlynck, 1991; Vigano, 1991). This defect was not attributable to a quantitative decrease in their numbers in either peripheral blood or peritoneal fluid. In the present study, we demonstrated that the proportion of NK cells was surprisingly increased in the endometrium of patients with endometriosis. This was entirely attributable to an increase in the CD56+CD16- subset, which corresponds to a poorly cytotoxic NK cell population in peripheral blood (Robertson, 1990). In a previous study, we identified an increased numbers of NK cells, B lymphocytes and monocytes in the follicular fluid of patients with endometriosis (Lachapelle, 1996) and many studies have identified a higher numbers of NK cells and monocytes/macrophages in the peritoneal fluid (Hill, 1988; Gleicher, 1984; Leiva, 1993; Badawy, 1984; Braun, 1992). In patients with unexplained infertility where immunologic factors are high on the list of potential offenders, we were unable to detect any variation in endometrial leukocytes populations. This finding does not eliminate an immune contribution, but decreases the likelihood of impaired cellular mechanisms. Thus, altered T and NK cell reactivity toward aberrantly located endometrial cells could explain, at least in part, the pathogenesis of peritoneal endometriosis.

In the peripheral blood, no difference was found in any lymphocyte subset between normal healthy women and those within either infertility category, suggesting that the immunologic dysregulation found in women with endometriosis and potentially tubal factor may be

prominent locally. All these facts for an endometrial etiology for endometriosis, and may be a fraction of tubal factor infertility.

Patients with repetitive abortions were previously found to have increased endometrial B cell populations, and an increased likelihood of subsequent pregnancy was documented in patients with low, almost normal B cell levels (Lachapelle, 1996). These findings, underline potentially important interactions between host B cells and allogenic paternal antigen. Since similar alloimmune reactions could be observed in infertile patients and, since flow-cytometry provided a reliable methodology to quantitate such low numbers of lymphoid cells, we evaluated B cell populations in our infertile patients, we found that the percentage of endometrial B cells was almost 3 times higher in patients with endometriosis than in normal controls. In contrast, B cell numbers were not increased in patients with isolated tubal factor, nor unexplained infertility. Interestingly, a high incidence of autoantibodies directed against phospholipids (particularly phosphatidyl serine, histones and nucleotides) has been reported in the peripheral blood of patients with endometriosis (Gleicher, 1987). As such antibodies are associated with infertility it will be important to determine, in future studies, whether this increased number of B cells represents local expansion leading to the production of allo-antibodies against paternal antigens and/or autoantibodies against ubiquitous phospholipid moieties. Altogether, the endometrium of patients with endometriosis is characterized by (i) decreased T-lymphocytes, (ii) increased NK cells (CD56+CD3- subset) and (iii) increased B lymphocytes. The same immunophenotypic profile was identified in the follicular fluid of infertile patients with endometriosis, underlying the stability of this immunologic imbalance (Lachapelle, 1996). Whether this is at the origin

of an active rejection process or a more passive effect on uterine microenvironment, through dysregulated cytokine production, remains to be elucidated.

Patients with tubal factors had lymphoid subsets almost identical to those in patient with endometriosis. However, when we tried to correlate clinical history and immunophenotypic findings, we found that more than half of patients with tubal factor did not have a history nor physical findings compatible with pelvic inflammatory disease (PID), and that most of these patients had an increased CD56/CD3 ratio, as observed in patients with endometriosis. In contrast, almost all patients with PID had a lower CD56/CD3 ratio ($p < 0.05$). Differences in immune cell subsets between patients with and without PID suggest different etiologies for tubal factors infertility and the involvement of immune mediators in patients with no clinical history of infection. It remains possible that adhesions in fallopian tubes, or other mechanical problems prevented the visualization of endometriosis implants, resulting in misdiagnosis. However, this would not explain why B-lymphocytes (CD20) populations were not increased in tubal factor patients as seen in endometriosis patients, unless B cell normalization would have accompanied spontaneous clearing of endometriosis. Thus, we would hypothesize that immunologic mechanisms are also prevalent in tubal factors. Whether this phenomenon is related or not to endometriosis will need further investigation.

Presently, the "gold standard" for the diagnosis of endometriosis remains direct visualization of the pelvis by laparoscopy or laparotomy. However, such procedures are invasive. Moreover, there are circumstances where direct visualization by laparoscopy or laparotomy is difficult or inaccurate. Serum measurement of CA-125 (Barbieri, 1986; Pittaway, 1986), placental protein 14 (Telimaa, 1989), amino-terminal propeptide of type III procollagen

(Spuijbroek, 1992), and anti-endometrial antibodies (Mathur, 1992) have all been evaluated as markers for endometriosis, yet no methods reached sufficient positive and negative likelihood ratios to be used as screening tools (Evers, 1995). In our study, we found that patients with increased CD56/CD3 ratios in their endometrium had a high probability of having endometriosis. In fact, a CD56/CD3 ratio above 1.2 was highly specific for endometriosis (more than 80%). It is particularly important to be able to identify patients with endometriosis since a ratio above 1.2 indicated a diagnosis of endometriosis or tubal factor with a specificity of 97%. Importantly, it was also possible to discriminate between these two groups of patients by evaluating the number of CD20+ cells. Indeed, all patients with tubal factor had less than 17% endometrial B cells. Two patients with unexplained infertility, also had a CD56/CD3 ratio above 1.2, yet these 2 women also had low numbers of CD3+ (36%) cells and a high proportion of CD56+ (32%) and CD20+ (17%) cells, a profile identical to that of patients with endometriosis, and more marked in patient never pregnant, as was the case for these patients. Thus, it is possible that these 2 patients with unexplained infertility actually had minimum or hidden endometriotic lesions that could not be identified on laparoscopic examination. However, previous knowledge of above immunophenotypic characteristics could have prompted additional peritoneal biopsies. In light of these results, the evaluation of CD56/CD3 ratio, and CD20+ cells could become a novel noninvasive screening test for patients with infertility. As flow-cytometry is widely available, it should facilitate the diagnosis of endometriosis and tubal factor, and decrease the need for diagnostic laparoscopy.

Acknowledgments. The authors thank the obstetrician-gynecologists and nurses of Maisonneuve-Rosemont Hospital and Institut de Médecine de la Reproduction de Montréal

for their help in providing endometrial tissue for this study, Dr. Jean Lambert of the department of medicine social et preventive at the University of Montreal for his help with statistical analysis. Also, the authors are grateful to Anick Hébert for her excellent technical assistance.

TABLE I: PATIENT CHARACTERISTICS

PATIENT GROUP	PATIENT (N)	ÂGE (MEAN±SD)	GRAVIDA (MEAN±SD)	PARA (MEAN±SD)	ENDOMETRIAL DATING (MEAN±SD)
ENDOMETRIOSIS	52	31 ±6	0 ±1*	0± 0*	21± 4
STAGE I^a	22	32 ±4	0 ±1*	0 ±0*	23 ±3
STAGE II	13	34 ±4	1 ±1*	0 ±0*	21 ±1
STAGE III	9	33 ±3	1 ±1*	0 ±0*	19 ±3
STAGE IV	8	29±5	0 ±1*	0 ±0*	23 ±3
UNEXPLAINED INF.	50	31 ±5	0 ±1*	0 ±0*	22 ±2
TUBAL FACTOR	20	31 ±4	1 ±1*	0 ±0*	21 ±1
CONTROL	15	35 ±4	3± 1	3±1	21 ±3

* Statically significant difference with the control group ($p < 0.05$)

^a Staging according to the rAFS classification. All patients underwent diagnostic laparoscopy.

TABLE II: POTENTIAL MARKERS FOR DISEASE CATEGORY

ENDOMETRIOSIS	SENSITIVITY	SPECIFICITY
CD3 <36%	61%	63%
CD56 >32%	47%	84%
CD20 >17%	42%	83%
CD56/CD3 >1.2	40%	81%
ENDOMETRIOSIS and/or TUBAL FACTOR		
CD3 <36%	63%	73%
CD56 >32%	46%	94%
CD56/CD3 >1.2	48%	97%

LEGENDS:

Fig.1: Flow-cytometric evaluation of endometrial leukocytes from infertile patients with and without endometriosis and fertile controls. The percentage (mean±SD) of antigen positive cells was measured in 122 infertile patients: 52 with endometriosis (black columns), 20 with tubal factor (without endometriosis) (white columns) and 50 with unexplained infertility (gray columns) and also 15 healthy fertile women (striped columns). T-lymphocytes (CD3+) (A), NK cells (CD56+) (B), T-helper/inducer (CD4+) (C), T-suppressor/cytotoxic cells (CD8+) (D), monocytes/macrophages (CD14+) (E) and B-lymphocytes (CD20+) (F) were evaluated. * statistically significant difference with controls, ** statistically significant difference with unexplained infertiles ($p<0.05$).

Fig.2: Evaluation of CD56/CD3 ratio for each individual subject with endometriosis, tubal factor infertility, unexplained infertility and controls (A); The CD56/CD3 ratio from 52 infertile patients with endometriosis was compared to that of 50 patients with unexplained infertility, 20 patients with tubal factor with (open circles) and without (closed diamonds) PID and to 15 healthy fertile women. (B) The percentage of CD20+ cells was lower in patients with tubal factor (open circles) than endometriosis (close diamonds) ($p<0.005$) indiscriminately of CD56/CD3 levels.

Fig.3: Endometrial leukocytes vs disease severity of endometriosis. The immunophenotypic profile of endometrial leukocytes from 22 women with stage I endometriosis (black columns), 13 with stage II (white columns), 9 with stage III (stippled columns) and 8 with stage IV (striped columns) was compared to 15 healthy fertile women (vertically striped

columns). The percentage of A) T lymphocytes (CD3+), B) NK cells) (CD56), C) B lymphocytes (CD20) and D) CD56/CD3 ratio were evaluated. (*significantly different compared to control $p < 0.05$)

Fig.4: Impact of previous pregnancy on lymphoid populations. In the endometriosis group the percentage of CD3+ cells (A) and NK cells (B) were determined according to previous pregnancy.

Fig.5: Distribution of NK cell subsets. The NK cells from infertile patients with endometriosis (n=21), tubal factor (without endometriosis) (n=8), unexplained infertility (n=22) and from healthy fertile women (n=7) were plotted according to their pattern of expression of CD16 antigen (CD56+CD16- = black columns, CD56+CD16+ = white columns). (* significantly different compared to control $p < 0.05$)

Fig.6: Flow-cytometric evaluation of peripheral blood leukocytes. The percentage (mean \pm SD) of antigen positive cells was measured in 20 infertile patients with endometriosis (black columns), 9 tubal factor (white columns), 16 unexplained infertility (stripped columns) and 15 healthy fertile women (striped columns).

REFERENCES:

Anderson DJ and Hill JA (1988) Cell-mediated immunity in infertility. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 17: 22

Badawy SZA, Cuenca V, Marshall L, Munchback R, Rinas AC and Coble DAC (1984). Cellular components in peritoneal fluid in infertile patients with and without endometriosis. *Fertil Steril* 42: 704-707.

Barbieri RL, Niloff JM, Bast RC Jr, Schactzl E, Kistner RW, Knapp RC (1986). Elevated serum concentrations of CA-125 in patients with advanced endometriosis. *Fertil Steril* 45:630

Braun DP, Muriana A, Gebel HM, Rotman C, Rana N and Dmowski WP (1994). Monocyte-mediated enhancement of endometriosis cell proliferation in women with endometriosis. *Fertil Steril* 61: 78-84.

Bronson R, Cooper G and Rosenfield D (1984) Sperm antibodies: their role in infertility. *Fertil Steril* 42: 171

Bulmer JN, Johnson PM and Bulmer D, 1987. Leucocyte populations in human decidua and endometrium. In: Gill TJ, Wegmann TG (eds): *Immunoregulation and fetal survival*, Oxford University Press, pp. 111-134.

Coulam CB and Stern JJ (1992) Evaluation of immunological infertility. *Am J Reprod Immunol* 27: 130-5

Coulam CB, Moore SB and O'Fallon M (1988) Investigating unexplained infertility. *Am J Obstet Gynecol* 158: 1374

Dmowski WP, Steele RW, Baker GF (1981). Deficient cellular immunity in endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 141: 377-83.

Evers JLH, Dunselman GAJ, van der Linden PJQ (1995). New markers for endometriosis. In *Progress in the management of endometriosis, Proceeding of the 4th World Congress on Endometriosis, 25-28 may 1994, Salvador, Bahia, Brazil. The Parthenon Publishing Group.* 175-184

Fedele L, Marchini M, Bianchi S, Dorta M, Arcaini L and Fontana PE (1990) Structural and ultrastructural defects in preovulatory endometrium of normo-ovulating infertile women with minimal or mild endometriosis. *Fertil Steril* 53: 989-3

Garzetti GG, Ciavattini A, Provinciali M, Fabris N, Cignitti M and Romanini C (1993). Natural killer cell activity in endometriosis: Correlation between serum estradiol levels and cytotoxicity. *Obstet Gynecol* 81:665-668.

Gleicher N and El-Roeiy A (1988) The reproductive autoimmune failure syndrome (RAFS) *Am J Obstet Gynecol* 159: 223

Gleicher N, Dmowski WP, Siegel I (1984). Lymphocyte subsets in endometriosis. *Obstet Gynecol* 63:463.

Gleicher N, El-Roeiy A, Confino E, Friberg J (1987). Abnormal autoantibodies in endometriosis: is endometriosis an autoimmune disease? *Obstet Gynecol* 70:115.

Haas CG, Cinis DB and Schruber AD (1980) Immunological infertility: Identification of patients with antisperm antibody. *N Engl J Med* 303: 722

Halme J, Becker S, Hammond MG, Raj HG, Raj S (1983). Increased activation of pelvic macrophages in infertile women with mild endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 145:333.

Halme J, Becker S, Wing R (1984). Accentuated cyclic activation of peritoneal macrophages in patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 148:85.

Haney AF, Misukonis MA, weinberg JB (1983). Macrophages and infertility: oviductal macrophages as potential mediators of infertility. *Fertil Steril* 39:310.

Haney AF, Muscato JJ, Weinberg JB (1981). Peritoneal fluid cell populations in infertility patients. *Fertil Steril* 35: 696.

Healy DL, Trounson AO and Andersen AN (1994) Female infertility: causes and treatment. *Lancet* 343: 1539-1544

Hill JA and Anderson DJ (1988) Immunological mechanisms of female infertility. *Baillere's Clin Immunolo Allerg* 2: 551

Hill JA, Polgar K, Harlow BL and Anderson DJ (1992). Evidence of embryo- and trophoblast-toxic cellular immune response(s) in women with recurrent spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol*, 166: 1044-52.

Hull ME, Moghissi KS, Magyar DF and Hayes MF (1987) Comparison of different treatment modalities of endometriosis in infertile women. *Fertil Steril*; 47: 40-44

Iddekinge BV, Hofmeyr GJ, Bezwoda WR, Wadee AA and Rooy PV (1993) Recurrent spontaneous abortion: Histocompatibility between partner, response to immune therapy, and subsequent reproductive performance. *Am J Reprod Immunol* 30: 37-44

Isaacson KB, Galman M, Coutifaris C and Lyttle CR (1990) Endometrial synthesis and secretion of complement component-3 by patients with and without endometriosis. *Fertil Steril* 53: 836-41

Ishihara S, Taketane Y and Mizuno M (1991) Endometriosis impairs glycogen synthesis in human endometrium. *Int J Fertil* 36: 287-90

Iwasaki K-I, Makino T, Maruyama T, Matsubayashi H and Nozawa S (1993). Leukocyte subpopulations and natural killer activity in endometriosis. *Int J Fertil* 38: 229-234.

Jeannet M, Bischof P, Bourrit B and Vugnat P (1985) Sharing of HLA antigens in fertile, subfertile and infertile couples. *Transplant Proc* 17: 903

Kamat BR and Isaacson PG (1987) The immunocytochemical distribution of leukocytic subpopulations in human endometrium. *Am J Pathol* 127: 66-73

Kikuchi Y, Ishikawa N, Hirata J, Imaizumi E, Sasa H and Nagata I (1993). Changes of peripheral blood lymphocyte subsets before and after operation of patients with endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 72: 157-161.

King A, Wellings V, Gardner L and Loke YW (1989) Immunocytochemical characterization of the unusual large granular lymphocytes in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Human Immunology* 24: 195-205

Lachapelle M-H, Miron P, Hemmings R, Baron C and Roy DC. Flow-cytometric characterization of hematopoietic cells in non-pregnant human endometrium (1996). *AM J Reprod Immunol* 42:

Lachapelle MH, Hemming R, Roy DC, Falcon T and Miron P (1996) Flow cytometric evaluation of leukocyte subpopulations in the follicular fluids of infertile patients. *Fertil Steril* 65: 1135-40

Lachapelle MH, Miron P, Hemming R and Roy DC (1996) Endometrial T, B and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion. *J Immunol* 156: 4027-34

Leiva MA, Hasty LA, Pfeifer S, Mastroianni L and Lyttle CR (1993). Increased chemotactic activity of peritoneal fluid in patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 168: 592-598.

Marcus ZH, Soffer Y, Ben-David A, Peleg S and Nebel L (1973) Studies on sperm antigenicity: Delayed hypersensitivity to spermatozoa. *Eur J Immunol* 3: 75

Maruyama T, Makino T, Sugi T, Iwasaki KI, Ozaxa N, Matsubayashi H and Nozawa S (1993) Flow cytometric crossmatch and early pregnancy loss in women with a history of recurrent spontaneous abortion who underwent paternal leukocyte immunotherapy

Mathur S, Peress MR, Williamson HO, Youmans CD, Maney SA, Garrin AJ, Rust PF, Fudenberg HM (1992). Autoimmunity to endometrium and ovary in endometriosis. *Clin Exp Immunol*, 50, 259-66

McIntyre JA, Faulk WP, Nichols-Johnson V and Taylor CG. (1986). Immunologic testing and immunotherapy in recurrent spontaneous abortion. *Obstet Gynecol* 67: 169

McShane PM, Schiff I and Trentham D (1985) Cellular immunity to sperm in infertile women. *JAMA* 253: 3555-8

Mettler L and Schirwani D (1975) Macrophage migration inhibitory factor in female sterility.

Am J Obstet Gynecol 121: 117

Mosher WD and Pratt WF (1982) Fecundity, infertility and reproductive health in the United States. In Vital and Health Statistics Series Service, Washinton, D.c., U.S. Printing Office

Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH, 1989. Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. J Immunol 143: 3181.

Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR (1991). Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. Fertil Steril 56: 45.

Ota H, Igarashi S (1993). Expression of major histocompatibility complex class II antigen in endometriotic tissue in patients with endometriosis and adenomyosis. Fertil Steril 60:834-838.

Pittaway DE, Fayez JA (1986). The use of CA-125 in the diagnosis and management of endometriosis. Fertil Steril 46:790 pp. 111-134, 1987.

Rier SE, Martin DC, Bowman RE, Dmowski WP and Becker JL (1993). Endometriosis in Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) Following chronic exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Fundamental and applied toxicology 21:433-441

Robertson MJ and Ritz J (1990) Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 76: 2421

Roy DC, Tantravahi R, Murray C, Dear K, Gorgone B and Anderson KC (1990). Natural history of mixed chimerism after bone marrow transplantation with CD6-depleted allogeneic marrow: a stable equilibrium. *Blood* 75: 296-304.

Semino C, Semino A, Pietra G, Mingari MC, Barocci S, Venturini PL, Ragni N and Melioli G (1995). Role of major histocompatibility complex class I expression and natural killer-like T cells in the genetic control of endometriosis. *Fertil Steril* 64: 909-916.

Soffer Y, Marcus ZH and Nebel L (1976) Reactions leucocytaires in vitro aux spermatozoides humains chez des femmes infertiles. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 5: 621

Spuijbroek MD, Dunselman GAJ, Menheere PPCA, Evers JLH (1992) Early endometriosis invades the extracellular matrix. *Fertil Steril*, 58, 929-33

Starseva NV (1980). Clinico-immunological aspects in genital endometriosis. *Akush gynecol* 3:23

Tanaka E, Sendo F, Kawagoe S and Hiroi M (1992). Decreased natural killer cell activity in women with endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 34: 27-30

Telimaa S, Kauppila A, Ronnberg L, Suikkari A, Seppala M (1989). Elevated serum levels of endometrial secretory protein PP14 in patients with advanced endometriosis: suppression by treatment with danazol and high-dose medroxyprogesterone acetate. *Am J Obstet Gynecol*, 161, 866-71

The American Fertility Society (1985). Revised American Fertility Society classification of endometriosis. *Fertil Steril*, 43, 351-2

Triplett DA, Brandt JT, Musgrave KA and Orr CA (1988) The relationship between lupus anticoagulants and antibodies to phospholipid. *JAMA* 259: 550-4

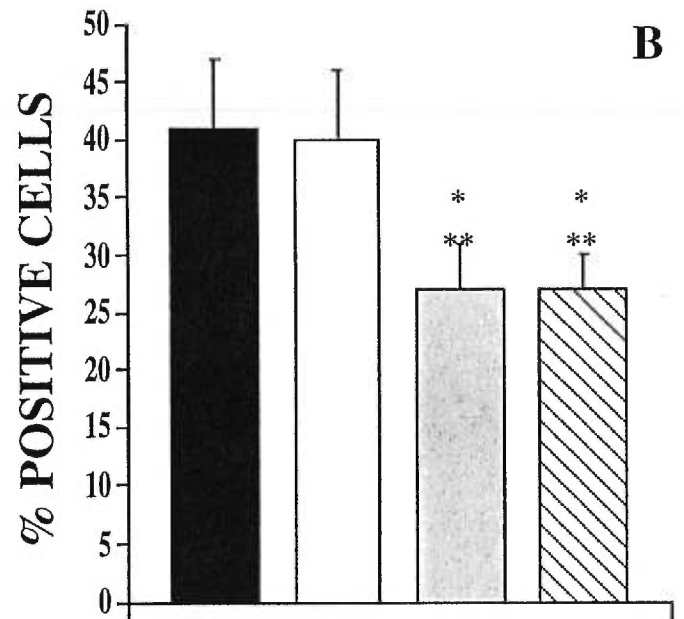
Vigano P, Vercellini P, Di Blasio AM, Colombo A, Candiani GB, Vignali M (1991). Deficient antiendometrium lymphocyte-mediated cytotoxicity in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 56:894-9.

Wah RM, Anderson DJ and Hill JA (1990) Asymptomatic cervicovaginal leukocytosis in infertile women. *Fertil Steril* 54: 445-50.

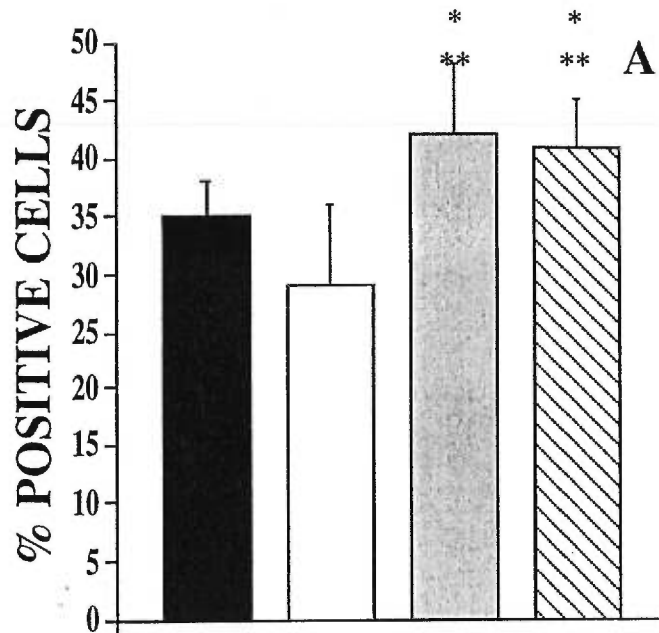
Wingfield M, Macpherson A, Healy DL and Rogers PAW (1995) Cell proliferation is increased in the endometrium of women with endometriosis. *Fertil Steril* 64: 340-6

Xu C, Hill JA and Anderson DJ (1987) Identification of T lymphocyte subpopulations in normal and abnormal human endometrial biopsies. (Abstr. 342) Presented at the Fifth Annual Meeting of the Society for Gynecologic Investigation, Atlanta, Georgia.

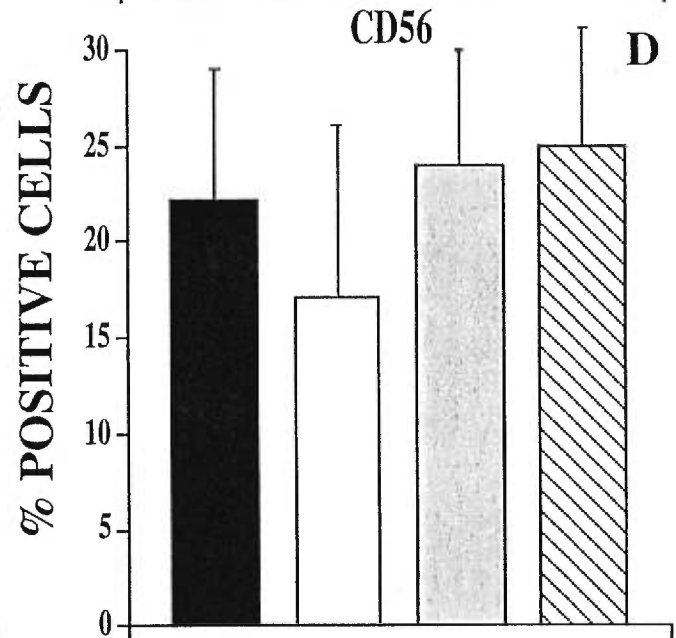
B



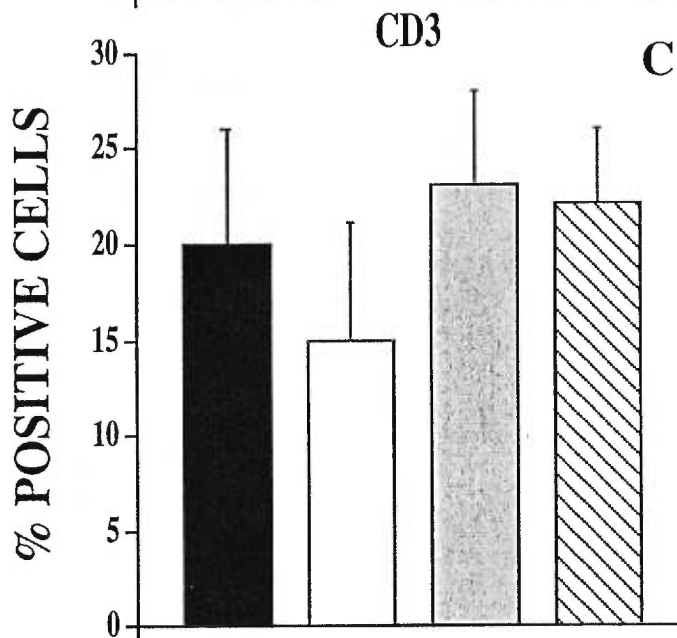
A



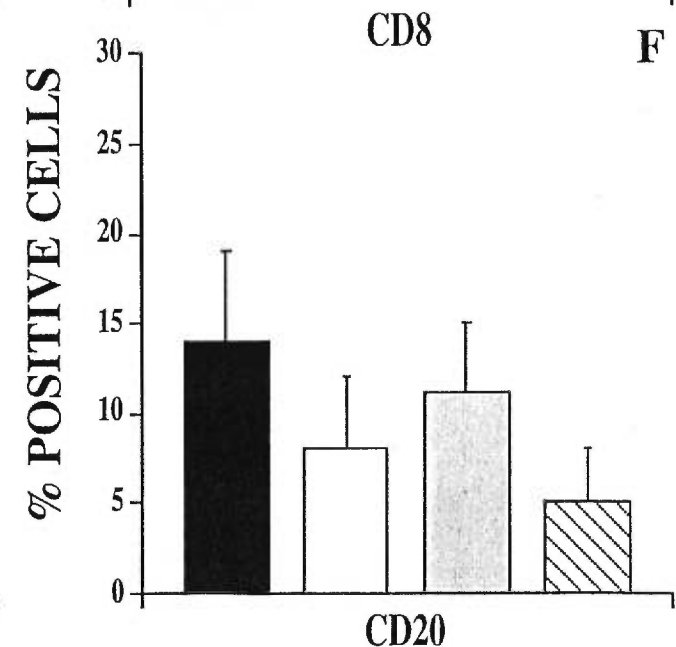
D



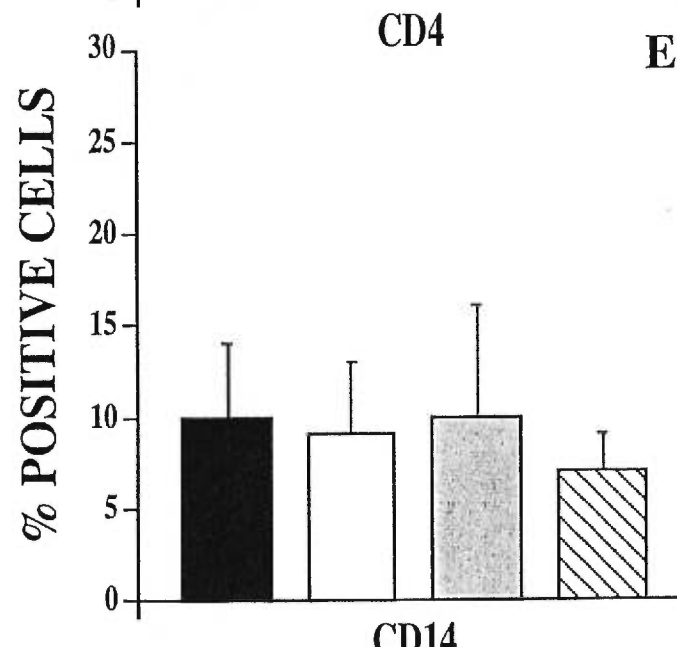
C

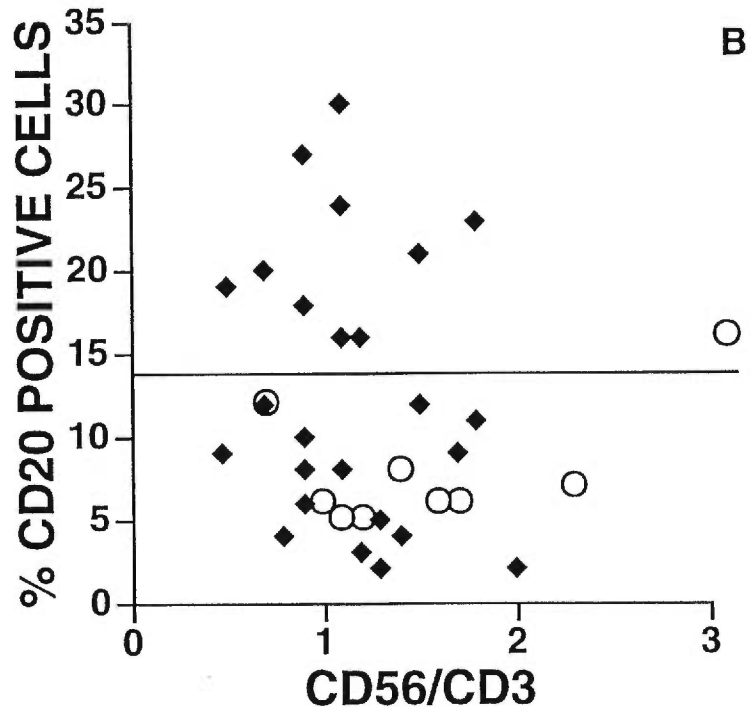
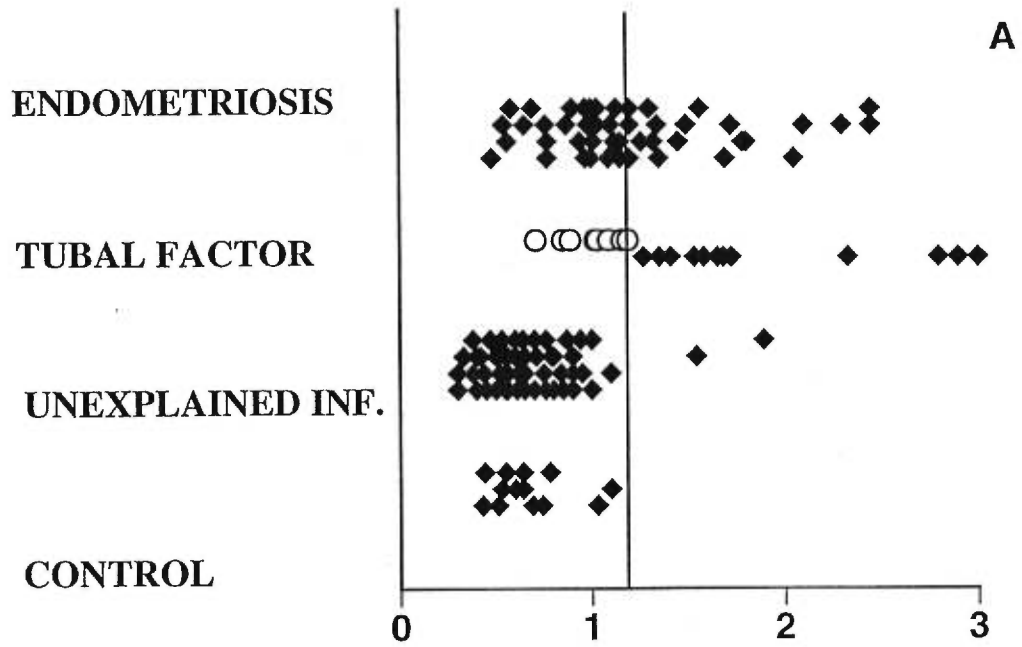


F

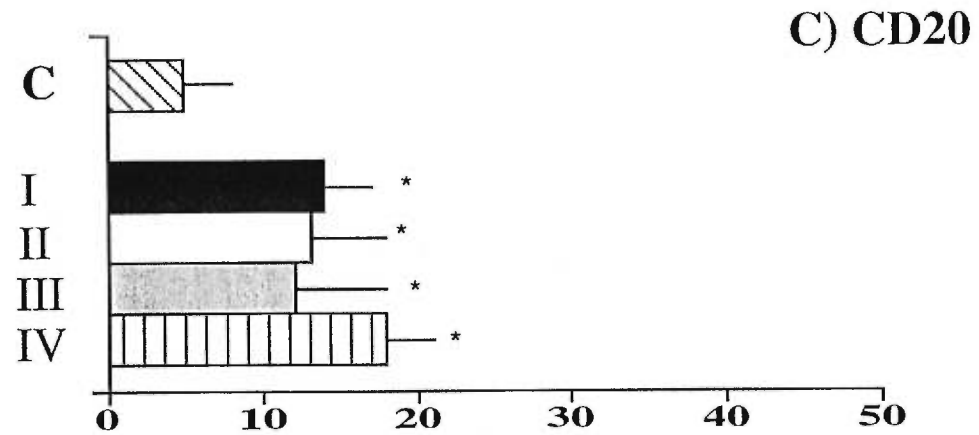
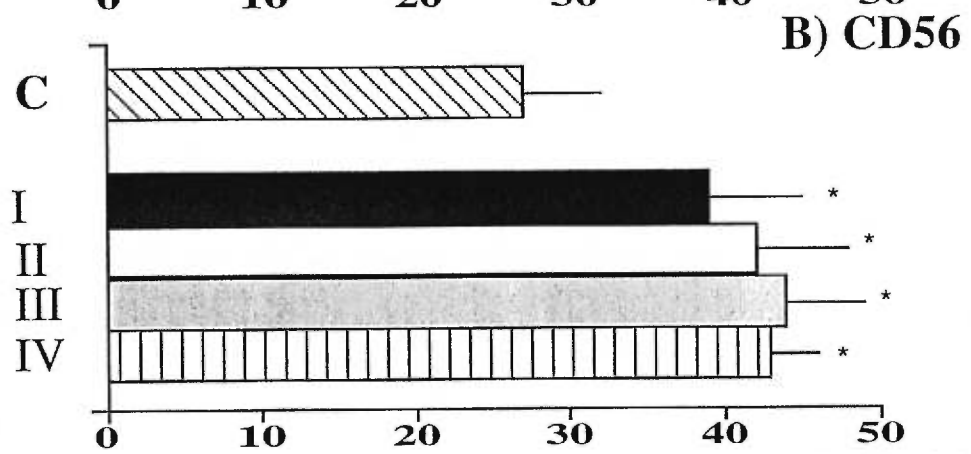
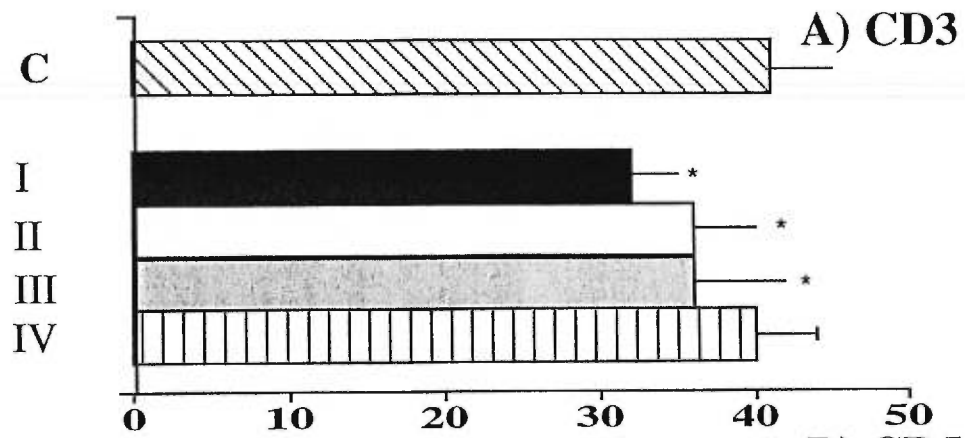


E

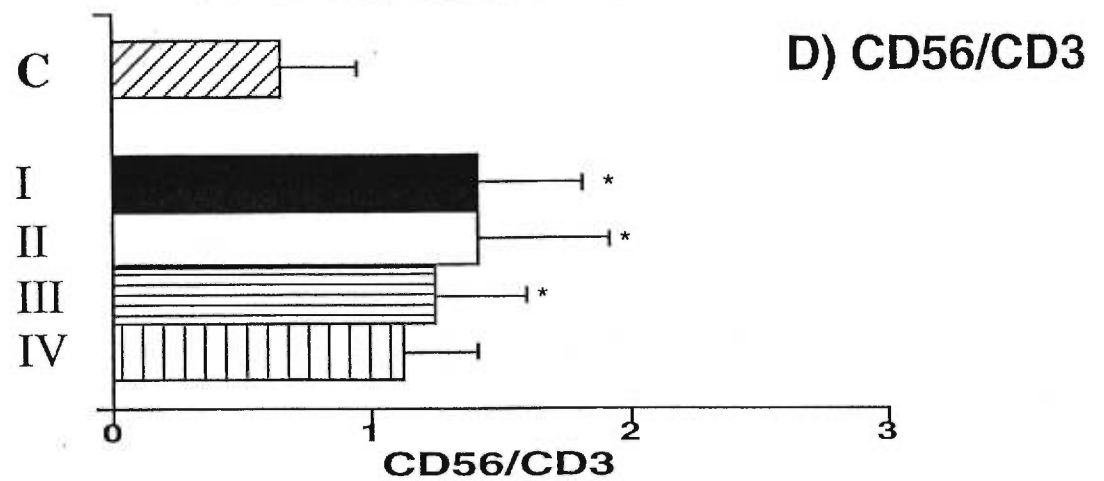


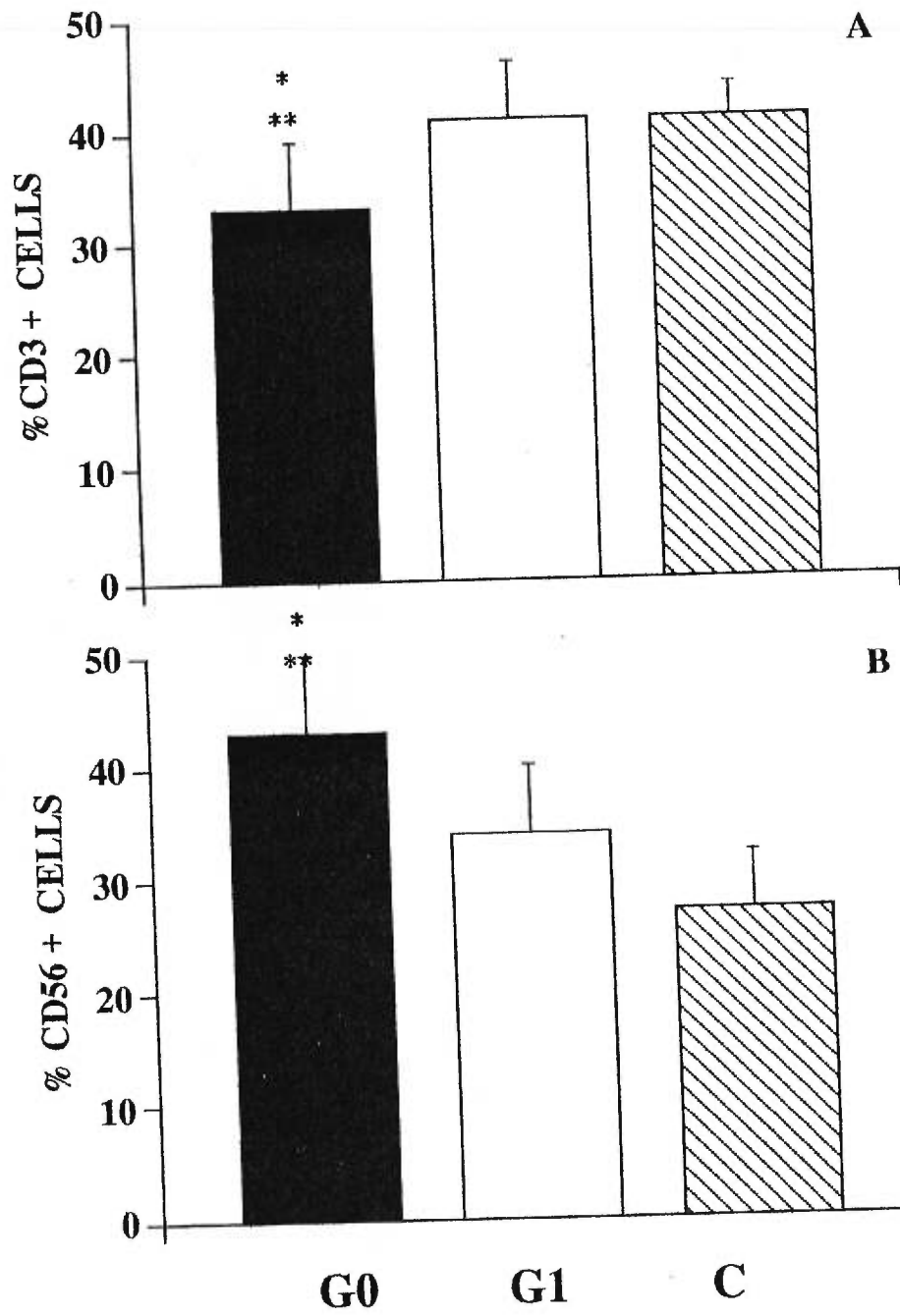


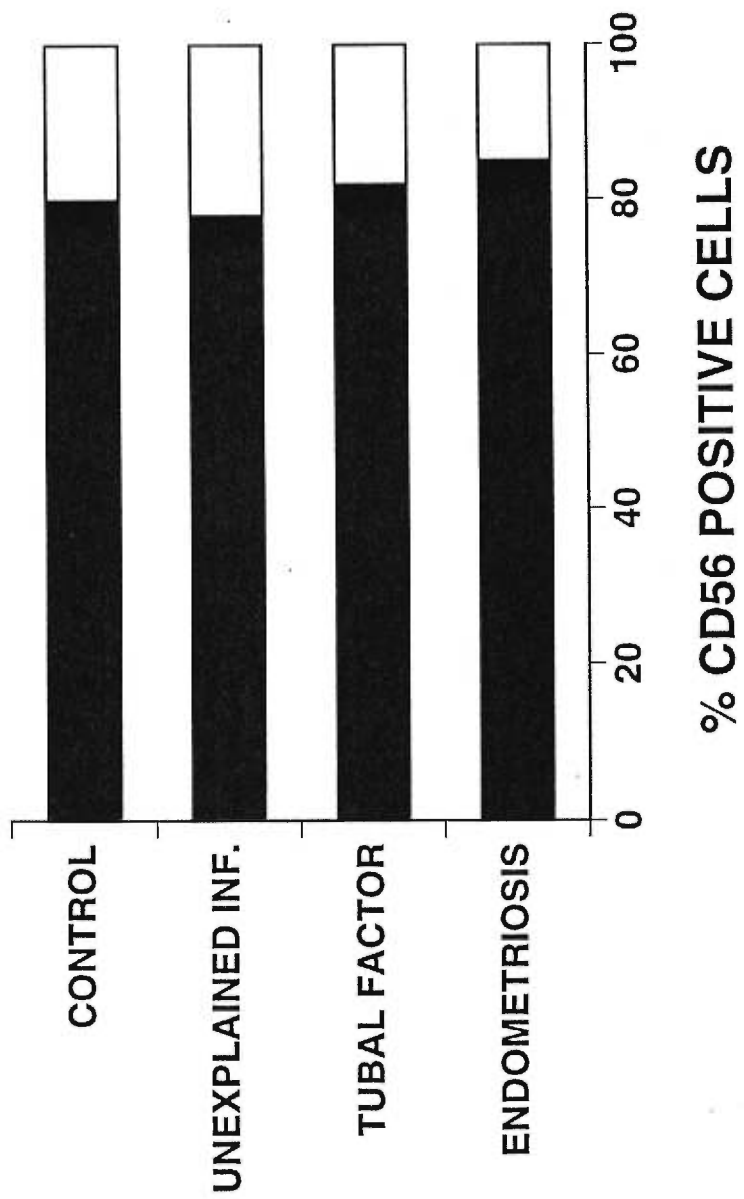
STAGE OF DISEASE

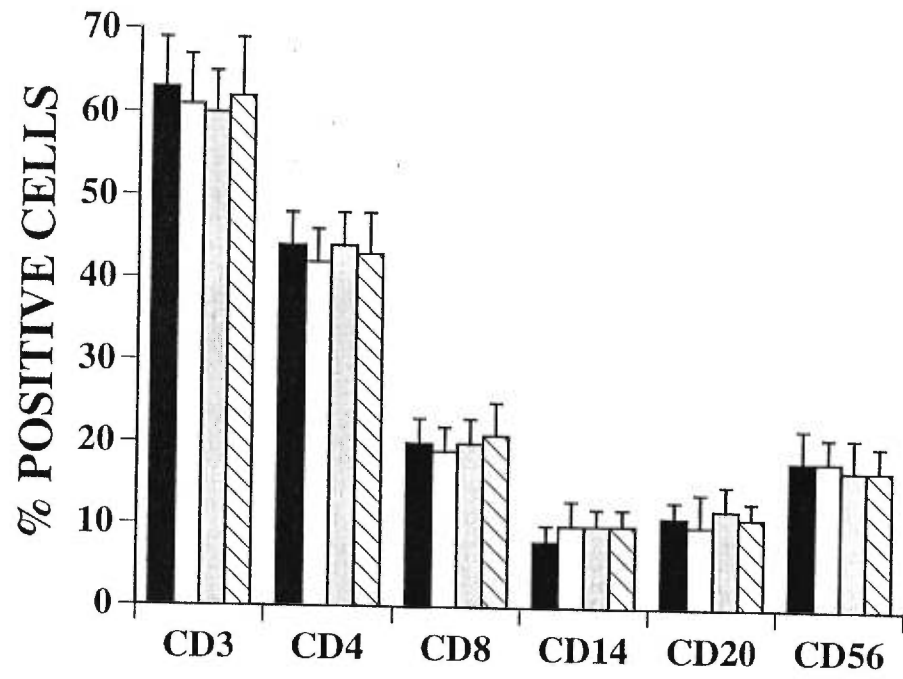


% POSITIVE CELLS









Flow cytometric evaluation of leukocyte subpopulations in the follicular fluids of infertile patients*

Marie-Helene Lachapelle, Ph.D.†‡ Tommaso Falcone, M.D.§
Robert Hemmings, M.D.§ Pierre Miron, M.D.†§
Denis-Claude Roy, M.D.||

Institut de Médecine de la Reproduction de Montréal, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Université de Montréal, and McGill University, Montréal, Québec, Canada

Objectives: To evaluate the leukocyte subpopulations present in follicular fluid (FF) of infertile patients undergoing IVF-ET for tubal factor, idiopathic infertility, and endometriosis.

Patients: Sixty patients undergoing IVF-ET with a tubal factor diagnosis (n = 35), idiopathic infertility (n = 13), and endometriosis (n = 12) had their subpopulations of FF leukocytes analyzed by flow cytometry.

Main Outcome Measure: Nonblood-contaminated samples of FF were collected under sterile conditions and centrifuged. Cells were labeled with a panel of monoclonal antibodies: anti-CD3, -CD4, -CD8, -CD14, -CD20, -CD45, and -CD56, and analyzed by cytofluorometry.

Results: Follicular fluid leukocytes from patients with idiopathic infertility had a significantly higher proportion of T lymphocytes than tubal factor and endometriosis patients. Endometriosis patients had significantly higher proportions of natural killer (NK) cells, B lymphocytes, and monocytes compared with groups of idiopathic infertility and tubal factor.

Conclusion: The differences observed in the leukocyte subpopulations from FF of patients with idiopathic infertility and endometriosis may affect folliculogenesis and oocyte maturation. Moreover, these modifications could be one of the factors altering their fertility.

Fertil Steril 1996;65:1135-40

Key Words: Leukocyte, follicular fluid, endometriosis, infertility

There is growing evidence that interactions between the immune and endocrine systems can influence ovarian functions (1-3). Nevertheless, the nature of these immunoregulatory elements has not been defined clearly. Until now, much attention has focused on the humoral composition of follicular fluids (FF) and many cytokines have been found, such

as tumor necrosis factor- α (4-6), interleukin 1 (IL-1) (5-7), IL-2 (5), platelet-activating factor (8), and insulin growth factor (9), but few studies have evaluated its content in immune cells.

Documentation of significant infiltration of FF by leukocytes and their evaluation by several groups led to major advances in the understanding of the physiology of human ovary. In fact, semiquantitative assessments have demonstrated that monocyte-macrophages, B cells, and T lymphocytes are present in FF of women undergoing IVF-ET (1-3, 10, 11). The functional role of leukocytes in the FF, however, remains unclear. In 1985, Sakagushi et al. (10) defined an active cellular interaction among T-lymphocyte subpopulations that could be responsible for maintaining immunologic self-tolerance to a variety of tissues, including reproductive tissues. Experiments by several investigators indicate that, in addition to preventing development of autoimmune diseases in the ovary, T-lymphocyte subpopulations

Received May 23, 1995; revised and accepted November 21, 1995.

* Supported by a grant from the Institut de Médecine de la Reproduction de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

† Department of Obstetrics-Gynecology, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Université de Montréal.

‡ Reprint requests: Marie-Helene Lachapelle, Ph.D., Institut de Médecine de la Reproduction de Montréal, 1100 Beaumont, Bureau 305, Montréal, Québec, Canada H3P 3H5 (FAX: 514-345-8978).

§ Department of Obstetrics-Gynecology, McGill University Montréal, Québec, Canada.

|| Department of Medicine, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Université de Montréal.

could play a role in immunoregulation of the different hormones involved in the follicular development (2, 3, 11). Moreover, a disturbance in the homeostasis of the local cellular immune system, which could affect the ovarian environment, could provide additional diagnostic possibilities.

The purpose of this study was to evaluate and quantitate leukocyte subpopulations present in FF of patients with tubal factor infertility, endometriosis, and idiopathic infertility by multiparameter flow cytometric analysis. Also, we measured changes in the proportion of leukocyte subpopulations during follicular development in each group of patients.

MATERIALS AND METHODS

Samples

After obtaining an informed consent according to Institut de Medecine de la Reproduction de Montreal Ethics Commeties, FF was collected from 60 women undergoing IVF-ET. In view of IVF-ET procedures, ovarian stimulation for multiple follicular growth was induced with the "long stimulation protocol" in all patients (12). Briefly, this included pretreatment with Leuprolide acetate, a GnRH analogue (Lupron; Abbott, Montréal, Québec, Canada) for ≥ 14 days, followed with injections of hMG (Pergonal; Serono, Mississauga, Ontario, Canada). Thirty-six hours after the onset of ovulation, triggered by an hCG injection (Sigma, St. Louis, MO), we proceeded to oocyte retrieval. Follicular fluid from mature (> 18 mm) and intermediate (between 14 and 18 mm) follicles were obtained by aspiration of the follicles with an ultrasonic transvaginal puncture, a mean of 3.5 mL FF per follicle was recovered in group of patients. Only FF samples free of visible blood contamination were used.

Cell Isolation

Follicular fluid was centrifuged at 1,200 rpm for 10 minutes and the supernatant was discarded. Cells were resuspended in 2 mL of RPMI-1640 medium (GIBCO, Grand Island, NY) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (GIBCO), 2% L-glutamine, and 1% penicillin-streptomycin. Cell concentration was determined with a hemocytometer and a mean of 2×10^6 cells were recovered per follicle in each group of patients.

Antibody Labeling and Flow Cytometry

Monoclonal antibodies (mAbs), directly conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) or phycoerythrin, were used to analyze the surface antigens of follicular leukocytes: anti-CD3 FITC (pan T cell), anti-CD4 phycoerythrin (helper-inducer T cell), anti-

Table 1 Patient Characteristics

Patient	Tubal factor	Idiopathic infertility	Endometriosis
Number of patients	35	13	12
Age (y)	$36 \pm 4^*$	34 ± 3	32 ± 4
Gravida	1.1 ± 1.6	1.0 ± 1.5	1.0 ± 0.7
Para	0.6 ± 1.1	0.4 ± 0.7	0.7 ± 0.8

* Values are means \pm SD.

CD8 FITC (suppressor-cytotoxic T cell), anti-CD14 FITC (monocyte-macrophage), anti-CD20 phycoerythrin (B cell), anti-CD56 phycoerythrin (NK cell) (Coulter Immunology, Hialeah, FL), and anti-CD45 FITC (pan leukocyte) (Becton Dickinson, San Jose, CA). Labeling of cells with this panel of mAbs was performed using standard techniques (13). Briefly, 5×10^5 cells were incubated with mAbs for 30 minutes at 4°C, and then washed twice and fixed in 0.1% p-formaldehyde (Sigma). Immunofluorescence reactivity was determined by cytofluorometry, analyzing 10^4 cells in each sample. Flow cytometry (Facstar; Becton Dickinson, San Jose, CA) was performed with an argon laser operating at 488 nm with an intensity of 200 mW. Background fluorescence was determined using isotype-matched nonreactive directly conjugated mAbs (MsIg-FITC and phycoerythrin) and was $< 2\%$ for all specimens analyzed.

Morphological Evaluation

Cells analyzed by the flow cytometer were sorted and cytocentrifuged (Shandon Cytospin II, Pittsburgh, PA) on glass slides. The slides were stained with Wright-Giemsa modified stain (Sigma) and evaluated under an optical microscope (400 \times) for morphological confirmation. Unpaired Student's *t*-tests were used for the statistical evaluation of the data ($P > 0.05$).

RESULTS

Patient Characteristics

Subjects in this study included infertile women with tubal factors ($n = 35$) or idiopathic infertility ($n = 13$) or women suffering from endometriosis (stage I, $n = 8$; stage II, $n = 4$). All patients had undergone extensive clinical evaluations to eliminate other potential causes of infertility. Clinical parameters between each group were not significantly different (Table 1).

Flow Cytometric Analysis

Follicular leukocytes were labeled with directly conjugated mAbs and evaluated by flow cytometry.

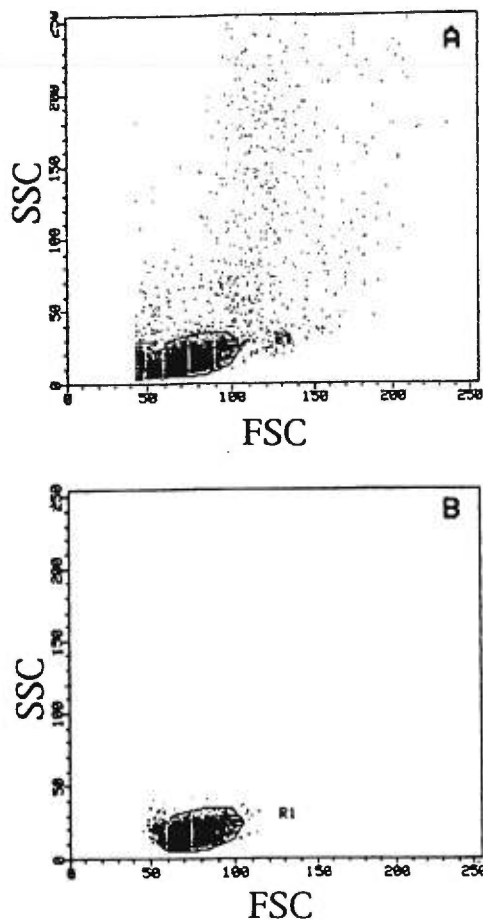


Figure 1 Flow cytometric characterization of follicular fluid leukocytes. (A), Dot plot of follicular leukocytes dispersed using a combination of forward and side light scatter. (B), Back-gating of CD45+ cells confirming that the majority of CD45+ cells localize within the gate. FSC, forward light scatter; SSC, side light scatter.

Using a combination of forward and side scatter, we could detect a majority of events at the bottom of the scattergram and locate our target cell population (Fig. 1A). To verify that the gating procedure did not exclude a significant proportion of leukocytes, follicular cells were labeled with a pan leukocyte mAb (anti-CD45) and back-gating was performed (14). As shown in Figure 1B, CD45+ cells corresponded to homogeneous cell population with low forward and side scatter characteristics and 95% of CD45+ cells were present within the narrowly set gate. Finally, to confirm the nature of these cells, we sorted CD45+ and CD45- cells. Sorted cells were cytocentrifuged and stained with Wright-Giemsa. The CD45+ cells were primarily leukocytes and, in contrast, CD45- cells were mostly granulosa cells (data not shown). Therefore, these observations validated our gating strategy for the immunologic evaluation of follicular leukocytes.

We subsequently measured target antigen expression by labeling cells with a panel of monoclonal antibodies. Figure 2 shows the analysis of a follicular leukocyte sample from a tubal factor patient, stained with FITC- or phycoerythrin-conjugated mAbs. We could measure the percentage of T and B lymphocytes, NK cells, and monocytes-macrophages as well as their intensity of fluorescence.

Immunologic Characterization

This methodology then was used to determine the immunophenotypic characteristics of 35 women with tubal factor, 13 women with idiopathic infertility, and 12 women with endometriosis (stage I or II) (15). Follicular fluid was obtained at the time of oocyte collection, by aspiration of the follicles, and the maturation level of each follicle punctured was noted. To determine the proportion of leukocytes in each sample, we measured the percentage of CD45+ cells. The mean percentage of CD45+ cells was >75% for each group of patients. To decrease intersample variability, all antigens evaluated were measured according to the number of CD45 cells. As shown in Figure 3, the number of CD3+ T cells was significantly increased in the idiopathic infertility group ($44\% \pm 8\%$) (mean \pm SD) in comparison to the tubal factor ($32\% \pm 5\%$) and endometriosis groups ($22\% \pm 9\%$) ($P < 0.05$). However, the proportion of helper-inducer (CD4+) and suppressor-cytotoxic (CD8+) T cells was identical in all patients. In the FF of patients with endometriosis, the mean percentage of B lymphocytes was $53\% \pm 20\%$; a number almost five times higher than the number of B cells in the idiopathic infertility or tubal factor patients ($P < 0.005$). Natural killer (CD56+) cells and monocytes-macrophages (CD14+) also were increased significantly in patients with endometriosis ($P < 0.05$).

Natural Killer Cell Population

Using two-color flow cytometric analysis, we identified a majority of CD56+CD3- NK cells (>75%) in the FF of all groups studied, and fewer CD56+CD3+ cells, which could correspond to nonmajor histocompatibility complex-restricted cytotoxic T cells (data not shown). We then determined whether CD56+ cells expressed FcR III (CD16) with a double-labeling approach. We found that >20% of CD56+ follicular cells expressed CD16 and had CD56 bright fluorescence in each of the three groups studied (data not shown).

Intermediate Versus Mature Follicles

To determine whether leukocyte populations varied according to the maturation status of the follicle,

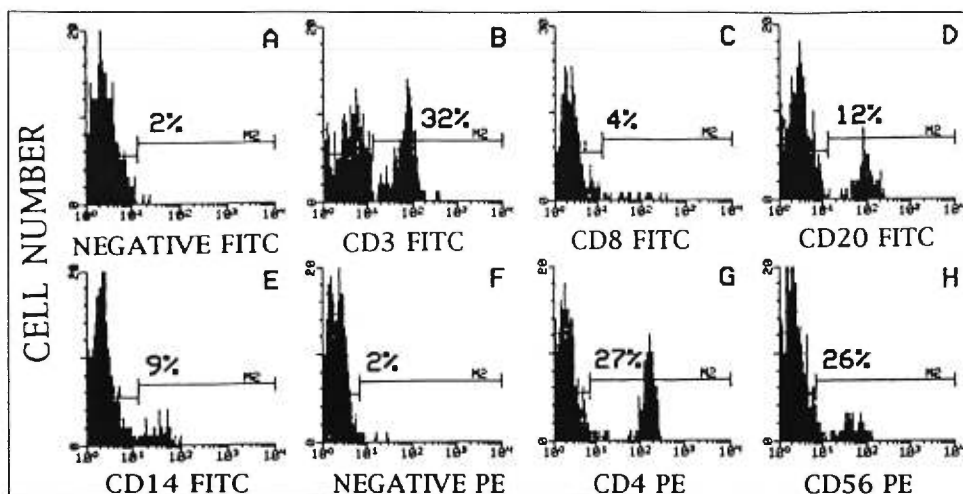


Figure 2 Log scale fluorescence histograms of follicular leukocytes from a tubal factor patient. Flow cytometric analysis was performed after labeling with a panel of mAbs; FITC labeled: (A), IgG control; (B), CD3; (C), CD8; (D), CD20; (E), CD14; and phycoerythrin labeled: (F), IgG control; (G), CD4; and (H), CD56. The horizontal bar (2) indicates the region for antigen-positive cells.

we compared the proportion of each cell population in the FF of intermediate (between 14 and 18 mm) and mature (>18 mm) follicles from tubal factor patients. As shown in Figure 4, no significant differences were observed between intermediate and mature follicles. This was also true for idiopathic infertility and endometriosis patients. Age and number of previous pregnancies also had no impact on immunophenotyping results (data not shown).

DISCUSSION

The ovary is not an immunologically privileged compartment. However, for many years, active hu-

moral and cellular immune reactions have been documented in this organ and its fluids (16). Moreover, the immune system could play a number of physiological roles in FF, including oocyte maturation, ovulation, fertilization, and more. To better defined leukocyte subpopulations present in FF of women with endometriosis, idiopathic infertility, and tubal factor infertility, we studied their immunophenotypic characteristics and distribution and compared these changes with E_2 content.

In this study, all samples evaluated by flow cytometry were obtained from patients undergoing IVF-ET procedure. Patients with tubal factors were used as reference, after confirming that all other clinical parameters were normal. After immunologic phenotyping, we observed an increase in the proportion of

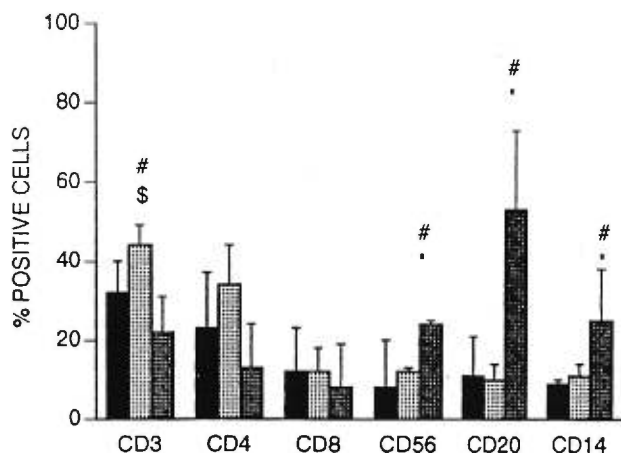


Figure 3 Flow cytometric evaluation of follicular leukocyte populations from women with tubal factors (■, n = 35), idiopathic infertility (□, n = 13), and endometriosis (▨, n = 12). The percentage of antigen positive cells is plotted for each group (mean ± SD). #Significantly different compared with tubal factor patients. \$Significantly different compared with endometriosis patients. *Significantly different compared with idiopathic infertility patients ($P < 0.05$).

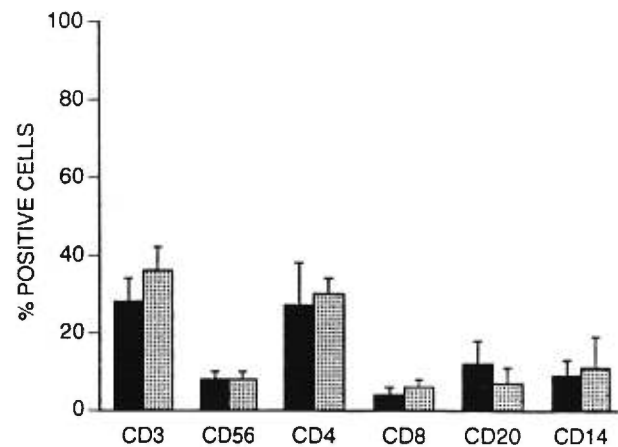


Figure 4 Influence of maturation status of the follicle. Follicular leukocyte populations of intermediate follicles (■, n = 21) were compared with those of mature follicles (□, n = 14) from tubal factor patients. The percentage of antigen-positive cells is plotted (mean ± SD).

T-lymphocytes in patients with idiopathic infertility in comparison to the tubal factor group. This increase corresponded primarily to a T helper and inducer subset, this last difference was yet not statistically significant. Considerable experimental findings suggest that an abnormal immune function may play a role in the etiology and pathogenesis of endometriosis. After our phenotyping analysis, we found that the FF of these patients was immunologically altered. Indeed, we identified a significant increase in NK cell, B-lymphocyte, and monocyte-macrophage populations.

We also inquired whether follicular lymphocyte profiles are affected by the follicular maturation status. There appeared to be a stable population of leukocytes within the microenvironment of the ovarian follicle during follicular phases, but further study will be needed to evaluate the leukocyte content in immature follicles.

The endocrine milieu surrounding a preovulatory oocyte may affect its potential for fertilization and cleavage (17, 18). Interestingly, IL-1 was shown to have a dose-dependent inhibition effect on E_2 secretion (7) and previous studies have demonstrated an IL-1 increase in the FF of patients with endometriosis (19, 20). These findings also could be related to the higher proportion of monocytes-macrophages that we documented in FF of the endometriosis group. Various abnormalities such as defective folliculogenesis (21–23), oligo-ovulation (24), and luteinizing unruptured follicle syndrome (25) have been proposed to explain the association between mild endometriosis and infertility. In light of our results, it can be speculated that the modifications in the distribution of immune cell populations in the FF of patients with endometriosis (stage I and II) and idiopathic infertility could influence folliculogenesis or oocyte maturation and the maintenance of self-tolerance. Thus, cellular immune dysregulation in human ovary could be one of the factors altering fertility.

Acknowledgments. The authors thank the obstetrician-gynecologists and nurses of Maisonneuve-Rosemont Hospital and Institut de Médecine de la Reproduction de Montréal for their help in providing endometrial tissue for this study. Also, the authors are grateful to Anick Hébert from the Institut de Médecine de la Reproduction de Montréal and Chantal Baron from Maisonneuve-Rosemont Hospital for their excellent technical assistance.

REFERENCES

- Hill JA, Barbieri RL, Anderson DJ. Detection of T8 (suppressor/cytotoxic) lymphocytes in human ovarian follicular fluid. *Fertil Steril* 1987;47:114–7.
- Droesch K, Fulgham DL, Liu H-C, Rosenwaks Z, Alexander NJ. Distribution of T cell subsets in follicular fluid. *Fertil Steril* 1988;50:618–21.
- Loukides JA, Loy RA, Edwards R, Honig J, Visintin I, Polan ML. Human follicular fluids contain tissue macrophages. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:1363–7.
- Punnonen J, Heinonen PK, Teisala K, Kujansuu E, Jansen CT, Punnonen R. Demonstration of tumor necrosis factor- α in preovulatory follicular fluid: its association with serum 17β -estradiol and progesterone. *Gynecol Obstet Invest* 1992;33:80–4.
- Wang LJ, Norman RJ. Concentrations of immunoreactive interleukin-1 and interleukin-2 in human preovulatory follicular fluid. *Hum Reprod* 1992;7:147–50.
- Barak V, Yanai P, Treves AJ, Roisman I, Simon A, Laufer N. Interleukin-1: local production and modulation of human granulosa luteal cells steroidogenesis. *Fertil Steril* 1992;58:719–25.
- Barak V, Mordel N, Holzer, Garshom Z, Treves AJ, Laufer N. The correlation of interleukin 1 and tumour necrosis factor to oestradiol, progesterone and testosterone levels in periovulatory follicular fluid of in vitro fertilization patients. *Hum Reprod* 1992;7:462–4.
- Lopez BA, Newman GE, Phizackerley PJ, Laird E, Ross C, Barlow DH. Platelet-activating factor levels in human follicular and amniotic fluids. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1992;46:39–44.
- Cataldo NA, Giudice LA. Insulin-like growth factor binding protein profiles in human ovarian follicular fluid correlate with follicular functional status. *J Clin Endocrinol Metab* 1992:821–9.
- Sakagushi S, Fukuma K, Kuribayashi K, Masuda T. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. *J Exp Med* 1985;161:72–87.
- Castilla JA, Sampalo A, Molina R, Samaniego F, Mozas J, Vergara F, et al. Mononuclear cell subpopulations in human follicular fluid from stimulated cycles. *Am J Reprod Immunol* 1990;22:127–9.
- Hemmings R, Lachapelle M-H, Falcone T, Miron P, Ward L, Guyda H. Effect of follicular fluid supplementation on the in vitro development of human pre-embryo. *Fertil Steril* 1994;62:1018–21.
- Roy DC, Tantravahi R, Murray C, Dear K, Gorgone B, Anderson KC. Natural history of mixed chimerism after bone marrow transplantation with CD6-depleted allogeneic marrow: a stable equilibrium. *Blood* 1990;75:296–304.
- Melamed MR, Lindmo T, Mendelsohn ML. Flow-cytometry and sorting. 2nd ed. New York: Wiley-Liss, 1990.
- The American Fertility Society. Revised American Fertility Society classification of endometriosis: 1985. *Fertil Steril* 1985;43:351–2.
- Lee MS, Ben-Rafael Z, Meloni F, Mastroianni L, Flickinger GL. Relationship of human oocyte maturity, fertilization and cleavage to follicular fluid prolactin and steroids. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1987;4:168–72.
- Subramanian MG, Sacco AG, Moghissi KS. Human follicular fluid: prolactin is biologically active and ovum fertilization correlates with estradiol concentration. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1988;5:129–33.
- Leese HJ, Lenton EA. Glucose and lactate in human follicular fluid: concentrations and interrelationships. *Hum Reprod* 1990;5:915–9.
- Mahmood TA, Arumugam K, Templeton AA. Oocyte and follicular fluid characteristics in women with mild endometriosis. *Br J Obstet Gynaecol* 1991;98:573–7.
- Fakih H, Baggett B, Holtz G, Tsang K-Y, Lee JC, Williamson HO. Interleukin-1: a possible role in the infertility associated with endometriosis. *Fertil Steril* 1987;47:213–7.
- Eissa MK, Sawers RS, Docker MF, Lynch SeS, Newton JR.

- Characteristics and incidence of dysfunctional ovulation patterns detected by ultrasound. *Fertil Steril* 1987;47:603-12.
22. Doody MC, Gibbons WE, Buttram VC Jr. Linear regression analysis of ultrasound follicular growth series: evidence for abnormality of follicular growth in endometriosis patients. *Fertil Steril* 1988;49:47-51.
 23. Tummon IS, Maclin VM, Radwanska E, Binor Z, Dmowski WP. Occult ovulatory dysfunction in women with minimal endometriosis or unexplained infertility. *Fertil Steril* 1988;50:716-20.
 24. Arumugam K, Mahmood TA, Sew-Chine King YF. The association of anovulation and endometriosis in the infertile female. *Aust NZ J Obstet Gynaecol* 1989;29:350-1.
 25. Dmowski WP, Radwanska E, Binor Z, Rana N. Mild endometriosis and ovulatory dysfunction: effect of danazol treatment on success of ovulation induction. *Fertil Steril* 1986;46:784-9.

3. DISCUSSION

Les évidences s'accumulent à l'effet qu'il existe une relation étroite entre le système immunitaire et le système reproducteur. Le système immunitaire exerce une action régulatrice sur le système endocrinien et influence donc les fonctions ovariennes et endométriales (Hill, 1987; Droesch, 1988; Loukides, 1990). Néanmoins, la nature de ces éléments immunorégulateurs n'est pas encore clairement définie. Cependant, le système immunitaire n'a pas seulement une influence sur les événements physiologiques, mais il peut également avoir un rôle pathologique. Par exemple, certains facteurs immunologiques ont été proposés comme étant responsables de l'infertilité d'origine indéterminée ou d'avortements à répétition idiopathiques (Coulam, 1988). Les principaux facteurs immunologiques identifiés sont les anticorps anti-phospholipides, les auto- et allo-anticorps anti-spermatozoïdes et les anticorps anti-HLA (Mosher, 1987; Gleicher, 1988; Bronson, 1984; McIntyre, 1986). Jusqu'à présent, c'est donc surtout l'immunologie humorale qui a été investiguée dans le système reproducteur. Or, ces anomalies humorales ne peuvent expliquer qu'une faible proportion des pathologies associées à l'infertilité. De plus, le déclenchement d'une réponse antigène-anticorps implique une activation préalable du système immunitaire à médiation lymphocytaire T, système qui implique aussi plusieurs autres types cellulaires dont les cellules dendritiques, les monocytes et les lymphocytes B. Une des raisons principales expliquant le fait que la contribution des médiateurs cellulaires n'ait pas été plus examinée jusqu'à maintenant, est le manque d'outils d'investigation appropriés.

La présence de leucocytes dans l'endomètre normal a été mise en évidence il y a près de 30 ans (Rahn, 1968), malgré cela, les caractéristiques immunologiques de ces cellules ainsi que leurs rôles restent toujours obscurs. Certaines hypothèses ont été élaborées pour expliquer leur présence. Par exemple, le tractus génital féminin est en continuité avec l'extérieur ce qui l'expose à divers micro-organismes, par conséquent, la présence de leucocytes pourraient contribuer à préserver la stérilité de la cavité utérine (Kamat, 1987). De plus, il est possible que les cellules hématopoiétiques aient un rôle anti-tumoral et préviennent le développement de cancers endométriaux (Herberman, 1981). Les leucocytes endométriaux auraient également un rôle régulateur de la réponse immune face au conceptus semi-allogénique. Les leucocytes endométriaux constituent une population difficile à étudier parce qu'elle ne représente qu'une petite fraction des cellules endométriales, la majorité des cellules étant glandulaires ou fibroblastiques. De plus, les méthodologies d'investigation immunologique de cette population cellulaire étaient limitées à des méthodes immunohistochimiques. C'est pourquoi dans un premier temps, nous avons mis au point une méthode d'enrichissement des cellules hématopoiétiques présentes dans l'endomètre humain non-gestant. Les diverses techniques d'isolement des cellules endométriales utilisées jusqu'à présent faisaient toutes appel à des traitements enzymatiques. Or, nous avons effectué différentes expériences qui nous ont permis de démontrer que la dissociation tissulaire avec des enzymes libérait des cellules hématopoiétiques mais au prix du clivage de plusieurs antigènes de surface retrouvés sur les cellules T, NK et autres. Afin de préserver l'intégrité de ces structures antigéniques, nous avons donc mis au point une méthode d'isolement des leucocytes endométriaux qui remplace l'étape de traitement enzymatique par une dissociation mécanique. Cette étape est suivie de filtrations séquentielles qui permettent de se débarrasser de la majorité des cellules

épithéliales et ainsi d'enrichir considérablement les cellules leucocytaires. Nous avons démontré que cette approche est hautement reproductible. Ceci nous a permis d'utiliser des anticorps monoclonaux, afin de reconnaître les différentes sous-populations hématopoiétiques via leurs antigènes de surface et de les caractériser au plan structurel.

Nous avons choisi une approche de cytométrie en flux pour identifier les antigènes de surface des populations endométriales car elle comporte plusieurs avantages énumérés dans le tableau VIII. Principalement, cette technique permet l'étude d'un grand nombre de cellules et donc l'évaluation de populations immunes qui représentent seulement une faible proportion des cellules extraites. De plus, cette approche permet l'évaluation concomitante de plusieurs antigènes de surface sur la même cellule, et donc une caractérisation multiparamétrique précise et spécifique. Dans un premier temps, la composition des leucocytes endométriaux de 12 femmes fertiles a été évaluée. Nous avons d'abord démontré que les biopsies endométriales, qui constituent le matériel de départ, pouvaient être étudiées en flux-cytométrie, comme les leucocytes sanguins, dans les 24 heures suivant leur prélèvement sans affecter les résultats, ce qui facilitait nos manipulations et rendait les résultats de nos études applicables dans un contexte clinique habituel. Cette étude nous a permis de démontrer que la cytométrie en flux peut être utilisée pour identifier les antigènes de surface qui caractérisent les différentes populations leucocytaires présentes dans l'endomètre non-gestant. Nous avons observé que les leucocytes endométriaux sont majoritairement composés de lymphocytes T ($47\pm 6\%$) et de cellules NK ($32\pm 8\%$). Il est important de noter que nos résultats sont en accord avec les études qualitatives de Bonatz (1992), King (1989) et Kamat (1987) effectuées avec

TABLEAU VIII**Avantages de la cytométrie en flux**

RAPIDE

EFFICACE

QUANTITATIF

FACILE à STANDARDISER

MINIMISE LA VARIABILITÉ INTEROBSERVATEUR

UTILISATION CLINIQUE

ANALYSE MULTIPARAMÉTRIQUE

TRI DE CELLULES

Adapté de: "Flow-Cytometry" par Lotzova (1992)

des méthodes immunohistochimiques. Nous avons également observé que les cellules NK présentes dans l'endomètre non-gestant ont un phénotype inhabituel. Ce sont majoritairement (80%) des CD16-CD56*bright*, sous-groupe qui ne représente que 10% des cellules NK du sang périphérique. Ce type de cellules NK avait déjà été mis en évidence dans des décidua humaines en début de grossesse (Saito, 1993; Starkey, 1988). Nous avons donc démontré que la présence de cellules NK CD16-CD56*bright* dans l'endomètre humain n'est pas une réaction face au fœtus mais plutôt une conséquence intrinsèque des conditions endométriales normales. De plus, la nature et la proportion des lymphocytes retrouvés au niveau endométrial sont différents de ceux retrouvés au niveau du sang, ce qui démontre la capacité de l'endomètre à non seulement assurer le maintien d'une population immune locale, mais à sélectionner des populations lymphoïdes qui lui sont propres.

Ces résultats nous ont aussi permis de déterminer le profil immunophénotypique des leucocytes endométriaux, profil que nous avons utilisé comme référence pour nos études évaluant la régulation immune chez les femmes ayant des problèmes de fertilité. Cette méthodologie a également ouvert la voie vers le tri cellulaire, une stratégie qui nous a permis de mieux étudier des populations cellulaires spécifiques et qui offre de nombreuses opportunités pour des études ultérieures de la prolifération et du potentiel cytotoxique des leucocytes endométriaux.

La première pathologie liée à l'infertilité que nous avons investiguée était l'avortement à répétition idiopathique. Cette méthode nous a permis de mettre en évidence chez les femmes

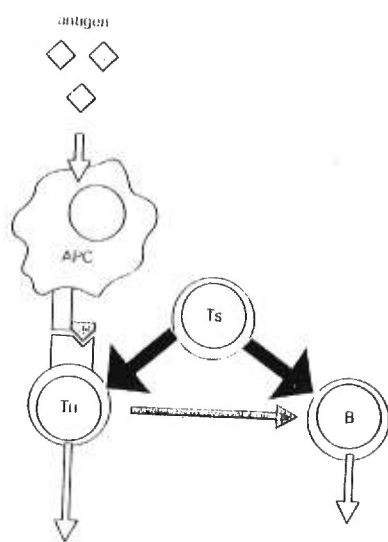
souffrant d'avortement spontané à répétition un déséquilibre immunologique au niveau de l'endomètre. Plus exactement, nous avons démontré que ces patientes ont un déficit significatif en lymphocytes T suppresseur/cytotoxique endométriaux et que le ratio CD4:CD8 est significativement augmenté chez ces patientes avec une valeur supérieure à 1, ce qui contraste avec les femmes fertiles où le ratio est inférieur à 1. Par contre, on retrouve une augmentation des lymphocytes B et des cellules NK exprimant le récepteur Fc γ III. Des études précédentes ont démontré que lors d'une gestation normale, les lymphocytes de la décidua humaine ont la capacité de supprimer la réponse proliférative de leurs lymphocytes sanguins (Daya, 1985). Également, l'unité fœto-placentaire produit plusieurs cytokines de type suppresseur TH2 à savoir de l'IL-4, IL-5 et IL-10, durant sa croissance (Lin, 1993). Finalement, une étude chez la souris a démontré que la décidua d'avorteuses spontanées avait, selon une analyse immunocytochimique, un moins grand nombre de lymphocytes T suppresseurs (Clark, 1988). À la lumière de toutes ces données, nous proposons un mécanisme immun local pour expliquer le phénomène d'avortement à répétition (Figure 4). Puisque, chez les femmes ayant des avortements à répétition, nous avons démontré qu'il y a une diminution des lymphocytes T, alors il est possible que les lymphocytes T suppresseurs endométriaux soient présents en nombre insuffisant pour supprimer la production de lymphokines (TNF- α , INF- γ , IL-2) induite par les lymphocytes T helper, ainsi que la sécrétion d'anticorps dirigés contre l'unité fœtoplacentaire. De plus, nous avons démontré que le nombre de cellules NK CD16+ est augmenté dans leur endomètre, et ces cellules ont une activité cytotoxique intrinsèque augmentée qui pourrait être dirigée contre le conceptus semi-allogénique. Donc les cellules NK ont une capacité augmentée à se fixer aux anticorps présents sur le fœtus via leur récepteur Fc et potentialisent la réaction de cytotoxicité médiée

Figure 4

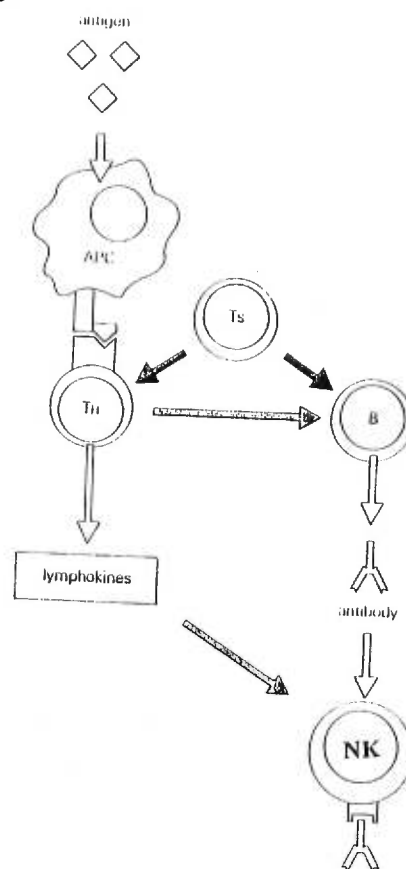
Mécanisme hypothétique impliqué dans l'avortement à répétition

A) Mécanisme immunologique normal lors d'une grossesse. Les antigènes fœtoplacentaires étrangers sont reconnus par les cellules présentatrices d'antigène (APC), ce qui enclenche le processus d'activation des lymphocyte T helper (Th). Par contre, la quantité de lymphocytes T supprimeurs (Ts) est suffisamment élevée pour supprimer l'activation des lymphocyte Th, des cellules NK non cytotoxiques (CD16-) et pour bloquer la génération de plasmocytes. Ceci explique donc l'état d'immunosuppression locale au niveau utéroplacentaire, ce qui permet le développement d'une grossesse à terme.

B) Mécanisme immunologique postulé chez les patientes avec avortements spontanés à répétition. Les lymphocytes T endométriaux sont diminués et leur nombre devient insuffisant pour supprimer la production de lymphokines par les Th et la sécrétion d'anticorps dirigé contre l'unité fœtoplacentaire. Les cellules NK CD16+ endométriales ont une activité cytotoxique intrinsèque augmentée qui est dirigée vers le conceptus semi-allogénique. De plus, ces derniers viennent se fixer aux anticorps anti-foetus via leur récepteur Fc et potentialisent la réaction de cytotoxicité médiée par les anticorps (ADCC). Ces événements mènent au déclenchement de l'avortement spontané.

A

**SUPPRESSION
DE LA RÉPONSE
IMMUNE**

B

AVORTEMENT

par les anticorps anti-foetus. Ces événements se concluent par le déclenchement de l'avortement spontané. Dans le modèle que nous postulons, trois populations cellulaires sont impliquées: les lymphocytes T et B ainsi que les cellules NK. Premièrement, la réduction du nombre de lymphocytes CD8+ dans l'endomètre de patientes avec avortements à répétition semble suggérer que les lymphocytes T suppresseurs joueraient un rôle dans la prévention d'un rejet du foetus par le système immunitaire maternel. De plus, la présence de ces cellules serait importante avant même l'induction d'une grossesse. Deuxièmement, la contribution des cellules NK à l'implantation de l'embryon est une donnée encore très controversée.

Plusieurs études suggèrent que les cellules NK seraient requises pour le maintien d'une grossesse et ce, à cause de leur capacité à sécréter plusieurs cytokines impliquées dans le développement fœtal (Wegmann, 1988; Saito, 1993; King, 1989, Bulmer, 1987). Par contre, d'autres études suggèrent que les cellules NK ont un effet délétère sur le foetus, résultant en un avortement spontané chez la souris (Gendron, 1988; Clark, 1994; Baines, 1990) ou chez l'humain (Yokoyama, 1994; Coulam, 1995; Aoki, 1995). De façon surprenante, nous avons observé que les patientes AR avaient la même proportion de cellules NK endométriales que les femmes fertiles. Par contre, il est connu que les cellules NK sont très hétérogènes tant au niveau phénotypique que fonctionnel, particulièrement en ce qui a trait à l'expression du CD16 (Nagler, 1989). Alors, nous avons observé que les patientes avec AR ont une augmentation de cellules NK CD16+, qui ont une activité cytotoxique augmentée dans leur endomètre, ce qui pourraient être à l'origine de l'interruption de grossesse. Il est aussi possible que la diminution du nombre de cellules NK CD16-CD56*bright* observée chez les patientes AR soit associée à une sécrétion de cytokines altérée qui serait incapable de fournir un

environnement propice au développement du conceptus. Il semble clair que les cellules NK auraient 2 rôles lors de la grossesse; le premier favorise la croissance des tissus foetaux et l'autre inhibe la prolifération. Ces 2 rôles pourraient être attribuables à 2 différentes sous-populations de cellules NK (CD16⁻ et CD16⁺) et l'équilibre entre ces 2 populations serait déterminant dans le maintien d'une grossesse. De plus, nous avons remarqué une certaine hétérogénéité chez les patientes avec avortements à répétition qui se reflète dans les populations immunitaires endométriales et influence le potentiel d'une grossesse future. En effet, nous avons observé que les patientes qui ont réussi à avoir une grossesse à terme suite à des avortements à répétition, avaient un ratio CD4:CD8 et un nombre de lymphocytes B comparables à ceux des patientes fertiles. Par contre, toutes ces patientes avec AR avaient des proportions identiques de cellules NK CD16⁺ qu'elles aient une grossesse ultérieure ou non. Nous pouvons donc affirmer que le déclenchement d'un avortement spontané implique un réseau complexe de cellules effectrices. Bien qu'une altération du profil de cellules NK soit nécessaire aux avortements à répétition, ces derniers semblent sous le contrôle de l'activation des lymphocytes B et ultimement des lymphocytes T, plus haut situé dans la cascade de l'axe de régulation immunologique.

L'endométriose semble avoir une pathogénicité liée à l'immunité. Jusqu'à présent, un débalancement immunologique au niveau sanguin et péritonéal avait été mis à jour. Grâce à notre approche méthodologique, nous avons pu démontrer qu'il y a un débalancement immunologique cellulaire au niveau endométrial beaucoup plus sévère que ce qui est retrouvé au niveau sanguin. Nous avons démontré que ces patientes ont un déficit significatif en lymphocytes T endométriaux, avec une diminution identique des lymphocytes CD4⁺ et

CD8+, de plus, on y retrouve une augmentation des cellules NK et des lymphocytes B. Contrairement à ce qui a été démontré dans le sang et le liquide péritonéal, les modifications immunophénotypiques de l'endomètre ne sont pas proportionnelles à la sévérité de la maladie, tout en étant présentes aux quatre stades (I-IV) de la maladie. Les cellules NK de phénotype CD56+CD16- , correspondant à une population de cellules NK faiblement cytotoxiques dans le sang périphérique (Robertson, 1990), sont augmentées dans l'endomètre. Plusieurs études ont également identifié une augmentation du nombre de cellules NK au niveau du liquide péritonéal (Hill, 1988; Gleicher, 1984; Leiva, 1993; Badawy, 1984; Braun, 1994) ainsi qu'une diminution de la cytotoxicité des cellules NK dans le sang et le liquide péritonéal (Garzetti, 1993; Iwasaki, 1993; Tanaka, 1992; Oosterlynck, 1991; Vigano, 1991) . La proportion de lymphocytes B a triplé dans l'endomètre de patientes avec endométriose. Or, une grande incidence d'auto-anticorps dirigés contre des phospholipides a été rapportée dans le sang périphérique de patientes avec endométriose (Gleicher, 1987). Ces résultats suggèrent qu'une altération au niveau de l'activité immune cellulaire, plus spécifiquement liée aux cellules NK et aux lymphocytes T et B, contre des cellules endométriales ectopiques serait à la base de la pathogenèse de l'endométriose.

Comme nous avons observé une augmentation des cellules NK et une diminution des lymphocytes T, nous avons évalué le ratio CD56/CD3 chez les patientes avec endométriose. Ce ratio est augmenté de façon hautement significative et l'utilisation du ratio CD56/CD3 pourrait fournir un outil de diagnostic qui éviterait aux patientes sans endométriose d'avoir à subir une chirurgie inutile sous anesthésie générale. Comparé à tous les autres marqueurs utilisés jusqu'à maintenant, il serait intéressant de développer une telle approche diagnostique

car elle pourrait comporter plusieurs avantages: diminution de la morbidité (chirurgie vs biopsie non-invasive), réduction des coûts, diminution du temps d'attente pour la procédure (salle d'opération vs bureau), éviter une laparoscopie à des patientes pour qui cela ne changera rien (infertilité inexplicée ou autre). De plus, cette nouvelle méthodologie pourrait être très utile dans l'identification précoce des patientes qui souffrent d'endométriose, permettant ainsi une intervention plus rapide. Alors une laparoscopie thérapeutique visant à éliminer les lésions endométriotiques effectuée plus précocement dans l'évolution de l'endométriose pourrait augmenter les chances de préserver la fertilité. De plus, nos résultats suggèrent que certains sujets pourraient souffrir d'endométriose mais que le dépistage aurait été manqué lors de la laparoscopie diagnostique. Alors, si un dépistage de l'endométriose sur la biopsie de l'endomètre était effectué préalablement à la laparoscopie diagnostique, cette dernière pourrait être plus exhaustive. De plus, des biopsies sériées du péritoine pourraient être effectuées afin de détecter une endométriose microscopique, ce qui permettrait d'entreprendre une approche thérapeutique immédiate.

Le liquide folliculaire est le site de modifications immunologiques humorales et cellulaires (Lee, 1987). Le système immunitaire semble être impliqué dans les processus physiologiques tels que la maturation ovocytaire, l'ovulation, la fécondation, etc (Droesch, 1988; Loukides, 1990; Castilla, 1990). Il pourrait également être impliqué dans des processus pathologiques tels que l'endométriose et les facteurs tubaires. C'est pourquoi nous avons étudié la composition leucocytaire du liquide folliculaire de patientes avec endométriose et infertilité idiopathique. Bien que nous ayons été dans l'impossibilité d'évaluer la composition leucocytaire du liquide folliculaire de femmes fertiles, nous avons pu utiliser comme contrôle,

le liquide folliculaire de patientes souffrant de facteurs tubaires, femmes avec un cycle ovulatoire normal. Nous avons démontré que les patientes souffrant d'endométriose ont également un débalancement immunologique cellulaire au niveau ovarien. Nous avons observé une augmentation de près de 5 fois de la population des lymphocytes B; les cellules NK et les monocytes/macrophages étaient également augmentés de façon significative. La population de cellules NK présentes dans le liquide folliculaire avait un phénotype majoritairement CD56+CD16-. Il est intéressant de constater que le même profil immunophénotypique NK et B a été identifié dans l'endomètre de patientes avec endométriose ce qui démontre une stabilité du désordre immunologique. Chez les patientes avec infertilité idiopathique, une augmentation des lymphocytes T surtout de type helper/inducer a été identifié dans leur liquide folliculaire. De plus, nous avons évalué l'influence du stade de maturation du follicule ovarien sur le profil lymphocytaire. Il apparaît que les différentes populations de leucocytes soient stables dans le liquide folliculaire provenant de follicules intermédiaires et matures. Par contre, de nouvelles études seront nécessaires pour évaluer le contenu leucocytaire des follicules immatures (>14mm) et leur similitude avec les stades de maturation plus avancés. Certaines études ont démontré une augmentation de la concentration de Il-1 dans le liquide folliculaire de patientes souffrant d'endométriose (Mahmood, 1991), alors, il est possible qu'il y ait une relation avec l'augmentation des monocytes/macrophages dans le liquide folliculaire.

Certaines études ont démontré que jusqu'à 30 à 40% des patientes qui souffrent d'endométriose sont également infertiles. Les altérations mécaniques encourues au cours des stades sévères interfèrent avec la fécondité. Par contre, l'infertilité est également associée à

l'endométriase lors de stades précoces (stade I et II). Des patientes souffrant d'endométriase I et II ont eu une étude de leur liquide folliculaire où nous avons constaté des modifications immunophénotypiques. De plus, des différences encore plus marquées avec les sujets normaux étaient rencontrées au niveau de l'endomètre des patientes avec endométriase de stade I et II que de stade III et IV. Diverses anomalies telles que folliculogénèse déficiente (Eissa, 1987; Doody, 1988; Tummon, 1988), oligo-ovulation (Arumugam, 1989) et syndrome du follicule non-rupturé (Dmowski, 1986), ont été proposées pour expliquer la relation entre l'endométriase et l'infertilité. A la lumière de nos résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse que les modifications de la distribution des cellules immunes du liquide folliculaire des patientes avec endométriase ont une influence sur la folliculogénèse, sur la maturation ovocytaire et/ou sur le maintien de la tolérance du soi. De plus, le dérèglement immun cellulaire retrouvé au niveau de l'ovaire et de l'endomètre de patientes souffrant d'endométriase I et II pourrait expliquer l'infertilité associée à l'endométriase de stade précoce. Dans une perspective future, il sera important d'évaluer les populations leucocytaires du liquide folliculaire de femmes fertiles afin de mieux caractériser les mécanismes immuns physiologiques. De plus, il sera particulièrement utile d'évaluer l'endomètre et le liquide folliculaire de patientes souffrant d'endométriase mais fertiles, afin de savoir si elles présentent les mêmes anomalies et s'il est possible d'identifier un profil immunologique relié à l'infertilité. Si ce n'est pas le cas, ceci renforcerait notre hypothèse d'effet immunologique local au niveau de l'endomètre plutôt que péritonéal ou autre.

L'interférence de l'endométriase au niveau de la fertilité pourrait être au niveau d'une réaction inflammatoire induite par l'endométriase qui pourrait amener une augmentation de la réponse

immune contre le fœtus, tel qu'observé dans les greffes de moelle osseuse où l'on retrouve une infection à CMV qui augmente l'incidence et la sévérité de la réaction du greffon contre hôte (GVH). En effet, une diminution des lymphocytes T CD8⁺ empêcherait l'élimination de l'endomètre ectopique, une augmentation des cellules NK CD56⁺CD16⁻ correspondant à des cellules NK peu toxiques, incapables aussi d'éliminer les plaques endométriotiques et qui par contre ont une grande capacité prolifératrice et peuvent synthétiser des cytokines qui favorisent l'implantation du tissu endométrial ectopique. Également la diminution des lymphocytes CD4⁺ réduit la sécrétion de cytokines favorable à la croissance foetale et l'augmentation des lymphocytes B, ce qui aurait pour effet d'augmenter la réactivité immune anti-fœtus et d'augmenter la production d'anticorps anti-fœtus. Finalement, la présence d'une réaction inflammatoire local prédispose à un dérèglement ovarien et augmente le potentiel de rejet. Toutes ces modifications immunophysiologiques vue dans un ensemble peuvent soutenir l'hypothèse de l'implication de l'endométriose dans l'infertilité.

Nos résultats indiquent 2 profils immuns chez les patientes avec facteurs tubaires; une catégorie avec maladie pelvienne inflammatoire documentée et l'autre idiopathique. Le profil immunologique des patientes avec facteurs tubaires de nature idiopathique, est hautement similaire à celui des patientes souffrant d'endométriose. Ces patientes souffrent-elles d'une forme d'endométriose occulte ou résolue? Des études ultérieures seront nécessaires pour répondre à cette question sans compter que cette étiologie pourrait expliquer plusieurs cas d'infertilité idiopathique. Plusieurs études affirment que l'origine de l'infertilité inexplicée observée de certaines patientes aurait une étiologie immunologique. Or, nous n'avons pu observer chez les 52 patientes étudiées, aucun désordre quantitatif au plan des cellules

immunitaires retrouvées au niveau de l'endomètre, et au niveau du liquide folliculaire seulement une augmentation des lymphocytes T a été observée. Ceci n'élimine pas que leur infertilité soit due à un problème immunologique puisqu'il pourrait provenir de l'extérieur de l'endomètre, dans les follicules par exemple. De même, des anomalies fonctionnelles plus subtiles pourraient mener à des désordres immunologiques et être à l'origine du problème de fertilité. Par exemple, des anomalies de l'expression des molécules d'adhésion impliquées dans la reconnaissance immune pourraient possiblement conduire à l'infertilité. En effet, les molécules d'adhésion sont nécessaires aux cellules NK pour exercer leur cytotoxicité (Robertson, 1990), celles-ci peuvent potentialiser ou inhiber le processus de reconnaissance immune suite à la présentation par les cellules dendritiques ou les lymphocytes B. Principalement, ce sont les molécules LFA-1 (CD11A-CD18), CD2, CD28, CD40 et ICAM-1 (CD54) (Macchia, 1993; Allen, 1993, Ahmed, 1996; Robertson, 1990). De plus, les molécules d'adhésion, plus spécifiquement le CD28, sont importantes dans la co-stimulation par le B7 pour l'activation des lymphocytes T. Un manque d'expression de l'antigène CD28 ou de l'antigène B7 réduit l'induction de la production d'IL-2 (Paul, 1994, Cardoso, 1997) et pourrait affecter la production d'anticorps bloquant nécessaire à la protection du conceptus. L'expression des molécules d'adhésion pourrait être évaluée en utilisant la méthode d'isolement des cellules endométriales décrite précédemment et une approche de cytométrie en flux avec des anticorps monoclonaux ou par biologie moléculaire avec des sondes spécifiques aux CAM. De plus, un modèle de souris transgéniques pourrait permettre de mesurer l'impact d'une anomalie de l'expression d'une ou plusieurs molécules d'adhésion sur la fertilité. Ainsi on pourrait peut être mettre à jour une nouvelle étiologie de l'infertilité et ainsi réduire le groupe de patientes avec infertilité idiopathique. Une anomalie fonctionnelle

pourrait également se situer au niveau de la production de cytokines. Différentes cytokines sont impliquées à différents niveaux du processus de reproduction, mais il est également vrai que plusieurs cytokines sont impliquées dans le processus pathologique correspondant. Il existe 2 profils de sécrétion de cytokines par les lymphocytes T helper; le TH1 qui sécrète IL-2, IFN- γ , TNF- β et le TH2 qui sécrète IL-4, -5, -6, -10, -13 (Mosmann, 1986) . Alors si une anomalie dans l'équilibre de ces 2 populations lymphocytaires T helper survient et qu'un déséquilibre au niveau de la concentration des cytokines est retrouvé au niveau du microenvironnement utérin, un processus pathologique conduisant à l'infertilité pourrait apparaître. Il reste donc plusieurs avenues à investiguer pour améliorer la condition de l'infertilité féminine et offrir de nouveaux outils diagnostiques et thérapeutiques.

Cette recherche a permis de mettre en lumière un dérèglement de l'immunité cellulaire dans plusieurs pathologies de la fertilité féminine, d'émettre des hypothèses physiopathologiques et d'identifier des épreuves de diagnostic précoce de certaines conditions liées à l'infertilité. Des travaux dans ces directions devraient permettre non seulement de mieux comprendre ces différentes pathologies, mais d'y apporter des solutions thérapeutiques.

4. CONCLUSIONS

La mise au point de cette méthode d'isolement des leucocytes endométriaux, a fourni un outil important pour l'étude du rôle des cellules du système immunitaire dans la reproduction. Cette nouvelle méthode permet l'évaluation et la quantification de petites populations leucocytaires inhabituelles ce qui était impossible à identifier avec les méthodes standards (immunohistochimie ou culture cellulaire). Cette étude a permis d'établir de façon précise la composition leucocytaire présente dans l'endomètre humain de femmes fertiles et ainsi d'établir et de valider nos valeurs de référence. Il a été démontré en comparant avec les valeurs de références que l'endomètre de femmes souffrant d'avortement à répétition, d'endométriose ou de facteurs tubaires possédaient plusieurs modifications immunophénotypiques. De plus, ces mêmes modifications immunophénotypiques se sont retrouvées dans le liquide folliculaire de patientes avec endométriose.

Les femmes souffrant d'avortement à répétition idiopathique ont un déficit de lymphocytes T supprimeur/cytotoxique endométriaux et une augmentation des lymphocytes B. Malgré que le nombre de cellules NK ne change pas, une augmentation de la sous-population de cellules NK exprimant le récepteur FcγIII a été observé. Ces modifications de populations cellulaires immunes sont présentes dans l'endomètre avant qu'il y ait initiation d'une grossesse, ce qui démontre un environnement hostile pour le conceptus à venir. De plus, nous avons postulé un mécanisme immun local impliquant une déficience de signaux supprimeurs dans l'endomètre qui serait responsable du phénomène d'avortement à répétition.

Les patientes qui souffrent d'endométriose ont un déficit de lymphocytes T endométriaux. Également, une augmentation des cellules NK et des lymphocytes B a été démontré dans l'endomètre et le liquide folliculaire de ces patientes. De plus, le liquide folliculaire démontre une augmentation de la population des monocyte/macrophage. Ces modifications ne sont pas proportionnelles à la sévérité de l'endométriose. Les altérations des populations T, NK et B retrouvées tant au niveau de l'endomètre non-gestant que du liquide folliculaire, mais non au niveau du sang, laissent sous-entendre un dérèglement de l'immunité cellulaire et humorale local chez les patientes avec endométriose.

Les femmes avec des facteurs tubaires ont des modifications immunophénotypiques similaires à celles de patientes souffrant d'endométriose, c'est-à-dire un déficit de lymphocytes T et une augmentation des cellules NK. Cependant, les lymphocytes B se situent à un niveau normal. Les populations leucocytaires endométriales et folliculaires de femmes avec infertilité inexplicée sont de proportions comparables à celle du groupe contrôle de femmes fertiles, à l'exception d'une augmentation des lymphocytes T, surtout marquée au niveau des lymphocytes T helper, dans le liquide folliculaire.

Grâce à la nouvelle méthodologie d'évaluation des populations leucocytaires que nous avons développée, nous avons pu identifier des modifications immunophénotypiques importantes dans l'endomètre et le liquide folliculaire des patientes atteintes des principales conditions associées à l'infertilité féminine. De plus, cette nouvelle méthodologie pourrait être très utile au niveau de l'identification précoce des patientes qui souffrent d'endométriose, permettant ainsi d'intervenir plus tôt. Nos résultats suggèrent que certains sujets pourraient souffrir

d'endométriose mais que le dépistage aurait été manqué lors de la laparoscopie diagnostique. Alors, si un dépistage de l'endométriose sur biopsie de l'endomètre était effectué préalablement à la laparoscopie diagnostique, cette dernière pourrait être plus exhaustive et des biopsies sériées du péritoine seraient effectuées afin de procéder à l'investigation d'endométriose microscopique.

En conclusion, ces résultats démontrent des modifications immunophénotypiques importantes chez des femmes infertiles et que ce phénomène de dérèglement immunologique pourrait être à l'origine de leurs problèmes de fertilité, et présente des implications étiopathogéniques majeures qui fournissent même des outils diagnostiques immédiats.

REMERCIEMENTS

Mes remerciements s'adressent en premier lieu à mon directeur de recherche, le docteur Denis-Claude Roy, qui m'a accordé sa confiance, sa patience, sa grande disponibilité et pour tous les conseils scientifiques qu'il m'a prodigués. Je tiens également à remercier mon co-directeur, le docteur Pierre Miron, pour sa disponibilité, ses judicieux conseils et pour son soutien. Mes recherches ont été rendues possibles grâce à une subvention de l'Institut de médecine de la reproduction de Montréal.

Mes compagnes et compagnons de laboratoire méritent toute ma reconnaissance, pour leur aide si précieuse et également pour avoir su créer une ambiance de travail agréable. Je voudrais plus particulièrement remercier Anick Hébert ma collaboratrice irremplaçable qui au cours du doctorat est devenue avant tout une amie.

Je veux aussi remercier toute l'équipe de l'Institut de médecine de la reproduction de Montréal (médecins, infirmières, techniciennes de laboratoire et personnel administratif) pour leur apport technique ainsi que leurs judicieux conseils.

Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance au département d'obstétrique-gynécologie de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont et plus particulièrement la clinique de fertilité, pour leur apport technique, leur disponibilité et leurs judicieux conseils.

Pour terminer, je veux témoigner de toute ma gratitude à mon mari, Pierre Larouche, non seulement pour sa patience, ses encouragements et son appui moral, mais surtout pour avoir

toujours cru en moi. De plus, je voudrais remercier mes parents et grand-parents pour leur encouragement et leur appui moral tout au long de cette recherche. Un merci spécial à ma mère pour le soin apporté à la correction de ce manuscrit.

5. BIBLIOGRAPHIE

Acosta AA, Buttram VC jr, Besch et al., 1973. A proposed classification of pelvic endometriosis. *Obstet Gynecol* 42: 19.

Ahmed R and Gray D, 1996. Immunological memory and prospective immunity: Understanding their relation. *Science* 272: 54.

Allen RC, Armitage RJ, Conley ME, Rosenblatt H et al, 1993. CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science*, 259: 990.

Anderson DJ and Hill JA, 1988. Cell-mediated immunity in infertility. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 17: 22.

Anderson HJA, Toder V, Mashiach S, Nebel L, Serr DM, 1990. Recurrent miscarriage: a review of recurrent concepts, immune mechanisms, and results of treatment. *Obstet Gynecol Surv* 45:657.

Aoki K, Kajiura S, Matsumoto Y, Ogasawara M, Okada S, Yagami Y and Gleicher N, 1995. Preconceptional natural-killer-cell activity as a predictor of miscarriage. *Lancet* 345: 1340.

Arp HJA, Toder V, Mashiach S, Nebel L and Serr DM, 1990. Recurrent miscarriage: A review of recurrent concepts, immune mechanisms, and results of treatment. *Obstet Gynecol Surv* 45: 657.

Arrive L, Hricak H and Martin MC, 1989. Pelvic endometriosis: MR imaging. *Radiology* 171: 687.

Arumugam K, Mahmood TA and Sew-Chine King YF, 1989. The association of anovulation and endometriosis in the infertile female. *Aust N Z J Obstet Gynecol* 29: 350.

Badawy SZA, Cuenca V, Marshall L, Munchback R, Rinas AC and Coble DAC 1984. Cellular components in peritoneal fluid in infertile patients with and without endometriosis. *Fertil Steril* 42: 704.

Badawy SZA, Cuenca V, Stitzel A, Jacobs RDB and Tomar RH, 1984. Autoimmune phenomena in infertile patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 63:271.

Baines MG and Gendron R, 1990. Are both endogenous and exogenous factors involved in spontaneous foetal abortion? *Res Immunol* 141: 153.

Band, 1991. In *Infertility and Reproductive Medicine*.

Barbieri RL, Niloff JM, Bast RC Jr, Schactzl E, Kistner RW, Knapp RC, 1986. Elevated serum concentrations of CA-125 in patients with advanced endometriosis. *Fertil Ster* 45:630

Barak V, Mordel N, Holzer, Garshom Z, Treves AJ, Laufer N, 1992. The correlation of interleukin-1 and tumour necrosis factor to oestradiol, progesterone and testosterone levels in periovulatory follicular fluid of in vitro fertilization patients. *Human Reprod* 7:462.

Barak V, Yanai P, Treves AJ, Roisman I, Simon A, Laufer N, 1992. Interleukin-1: local production and modulation of human granulosa luteal cells steroidogenesis. *Fertil Steril* 58:719.

Bayer SR, Seibel MM, Saffan DS et al., 1988. Efficacy of danazol treatment for minimal endometriosis in infertile women. *J Reprod Med* 33: 179.

Beer AE, 1988. Immunologic aspects of normal pregnancy and recurrent spontaneous abortion. *Semin Reprod Endocrinol* 6: 163.

Berkowitz RS, Hill JA, Kurtz CS, 1988. Effects of products of activated leukocytes (lymphokines and monokines) on the growth of malignant trophoblast cells in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 158: 199.

Bonatz G, Hansmann ML, Buchholz F, Mettler L, Radzun HJ and Semm K, 1992. Macrophage- and lymphocyte-subtypes in the endometrium during different phases of the ovarian cycle. *Int J Gynecol Obstet* 37: 29.

- Branch DW, Andres R, Digre KB, Rote NS, Scott JR, 1989. The association of antiphospholipid antibodies with severe preclampsia. *Obstet Gynecol* 73: 541.
- Braun DP, Muriana A, Gebel HM, Rotman C, Rana N and Dmowski WP, 1994. Monocyte-mediated enhancement of endometriosis cell proliferation in women with endometriosis. *Fertil Steril* 61: 78.
- Bronson R, Cooper G and Rosenfield D, 1984. Sperm antibodies: their role in infertility. *Fertil Steril* 42: 171.
- Bulmer JN, Johnson PM and Bulmer D, 1987. Leucocyte populations in human decidua and endometrium. In: Gill TJ, Wegmann TG (eds): *Immunoregulation and fetal survival*, Oxford University Press, pp. 111-134.
- Bulmer JN, 1989. Decidual cellular responses. *Curr Opin Immunol* 1: 1141.
- Caligiuri MA, Zmuidzinias A, Manley TJ, Levine H, Smith KA, Ritz J, 1990. Functional consequences of interleukin-2 receptor expression on resting human lymphocytes: identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J Exp Med* 171: 1509.
- Cardoso AA, Seamon MJ, Afonso HM, Ghia P, Boussiotis VA, Freeman GJ et al, 1997. Ex vivo generation of human anti-pre-B leukemia-specific autologous cytolytic T cells. *Blood*, 90: 549.

Carp HJA, Toder V, Gazit E, Orgad S, Mashiach S, Serr DM and Nebel L, 1988. Paternal leucocyte immunization and habitual abortion. *Contemp Rev Obstet Gynaecol* 1: 49.

Carpenter PC, 1988. Adrenal hypofunction. In: Mendelsohn G (ed) *Diagnosis and pathology of endocrine diseases*. Philadelphia Press, pp.193.

Carr DH, 1972. Cytogenetic aspects of induced and spontaneous abortions. *Clin Obstet Gynecol* 15: 203.

Castilla JA, Sampalo A, Molina R, Samaniego F, Mozas J, Vergara F, Garrido F, Herruzo A, 1990. Mononuclear cell subpopulations in human follicular fluid from stimulated cycles. *Am J Reprod Immun* 22:127.

Cataldo NA, Giudice LA, 1992. Insulin-like growth factor binding protein profiles in human ovarian follicular fluid correlate with follicular functional status. *J Clin Endocrin Metab* 821.

Chavez DJ, McIntyre JA, 1984. Sera from women with histories of repeated pregnancy losses cause abnormalities in mouse perimplantation blastocysts. *J Reprod Immunol* 6: 273.

Chihal HJ, Mathur S, Holtz GL and Williamson HO, 1986. An endometrial antibody assay in the clinical diagnosis and management of endometriosis. *Fertil Steril* 46:408.

Christiansen OB, Christiansen Bs, Husth M, Mathiesen O, Lauritsen JG, Grunnet N, 1992. Prospective study of anticardiolipin antibodies in immunized and untreated women with recurrent spontaneous abortions. *Fertil Steril* 58: 328.

Christmas SE, Bulmer JN, Meager A and Johnson PM, 1990. *Immunology* 71: 182.

Clark DA, 1992. Controversies in reproductive immunology. *Crit Rev Immunol* 11: 215.

Clark DA, 1994. Maternal aggression against placenta? *Am J Reprod Immunol* 31: 205.

Clark DA and Chaouat G, 1986. Characterization of the cellular basis for the inhibition of cytolytic effector cells by murine placenta. *Cellular Immunology* 102: 43.

Clark DA, Chaput A, Tutton D, 1986. Active suppression of host-virus-graft reaction in pregnant mice. VII: spontaneous abortion of allogeneic CBA/J DBA/Z fetuses in the uterus of CVA/J mice correlates with deficient non-T suppressor cell activity. *J Immunol* 136: 1668.

Clark DA, Faldo M, Rowley RB, 1988. Active suppression of host-virus-graft rejection in pregnant mice. IX: soluble suppressor activity obtained from allopregnant mouse decidua that blocks the response to interleukin-2 is related to TGF- β . *J Immuno* 141: 3833.

Clark DA, Slapsys R, Croy BA, Krcek J and Rossant J, 1984. Local active suppression by suppressor cells in the decidua: a review. *Am J Reprod Immunol* 5: 78.

Coulam CB, 1992. Immunologic tests in the evaluation of reproductive disorders: a critical review. *Am J Obstet Gynecol* 167: 1844.

Coulam CB and Clark DA, 1991. Report from the ethics committee for immunotherapy, American society for the immunology of reproduction. *Am J Reprod Immunol* 26: 93.

Coulam CB, Goodman RG, Thomason EJ and Beaman KD, 1995. Systemic CD56+ cells can predict pregnancy outcome. *Am J Reprod Immunol* 33: 40

Coulam CB, Moore SB and O'Fallon M, 1988. Investigating unexplained infertility. *Am J Obstet Gynecol* 158: 1374.

Coulam CB and Stern JJ, 1992. Evaluation of immunological infertility. *Am J Reprod Immunol* 27: 130.

Crepeau MA and Croy BA, 1988. Evidence that specific cellular immunity cannot account for death of *Mus caroli* embryos transferred to *Mus musculus* with severe combined deficiency disease. *Transplantation* 45: 1104.

Croy BA, Reed N, Malashenko BA, Kim k and Kwon, 1991. *Cell Immunol* 133: 116.

Daya S, Clark DA, Devlin C, Jarrell J and Chaput A, 1985. Suppressor cells in human decidua. *Am J Obstet Gynecol* 151: 267.

Daya S, Rosenthal KL and Clark DA, 1987. Immunosuppression factor(s) produced by decidua-associated suppressor cells: A proposed mechanism for fetal allograft survival. *Am J Obstet Gynecol* 156:344.

Dealtry GB, Naylor MS, Fiers W and Balkwill FR, 1987. DNA fragmentation and cytotoxicity caused by tumor necrosis factor is enhanced by interferon- γ . *Eur J Immunol* 17: 689.

DeWolf F, Carreras CO, Moermann P, 1982. Decidual vasculopathy and extensive placental infarction in a patient with repeated thromboembolic accident, recurrent fetal loss and a lupus anticoagulant. *Am J Obstet Gynecol* 142: 829.

Diedrich U, Hansmann I, Janke D, Opitz O and Probeck HD, 1983. Chromosome anomalies in 136 couples with a history of recurrent abortions. *Hum Genet* 65: 48.

Dmowski WP, 1987. Immunologic aspects of endometriosis. *Contr Gynecol Obstet* 16: 48.

Dmowski WP, Radwanska E, Binor Z and Rana N, 1986. Mild endometriosis and ovulatory dysfunction. Effect of danazol treatment on success of ovulation induction. *Fertil Steril* 46: 784.

Dmowski WP, Steele RW, Baker GF, 1981. Deficient cellular immunity in endometriosis. *Obstet Gynecol* 16: 93.

Doherty RA, Stubblefiels P, Dostal-Johnson DA, Day GJ, 1992. White blood cell immunization and anticardiolipin antibody levels in women with recurrent miscarriages. *Fertil Steril* 58: 199.

Doody MC Gibbons WE, Buttram VC, 1988. Linear regression analysis of ultrasound follicular growth in endometriosis patients. *Fertil Steril* 49: 47.

Droesch K, Fulgham DL, Liu HC, Rosenwaks Z, Alexander NJ, 1988. Distribution of T cell subsets in follicular fluid. *Fertil Steril* 50:618.

Eissa MK, Sawers RS, Docker MF, Lynch ScS and Newton JR, 1987. Characteristics and incidence of dysfunction ovulation patterns detected by ultrasound. *Fertil Steril* 47: 782.

Evers JLH, 1989. The pregnancy rate of the no-treatment group in randomized clinical trials of endometriosis therapy. *Fertil Steril* 52: 906.

Evers JLH, Dunselman GAJ, van der Linden PJQ, 1995. New markers for endometriosis. In *Progress in the management of endometriosis, Proceeding of the 4th World Congress on Endometriosis, 25-28 may 1994, Salvador, Bahia, Brazil. The Parthenon Publishing Group.* 175.

- Fedele L, Marchini M, Bianchi S, Dorta M, Arcaini L and Fontana PE, 1990. Structural and ultrastructural defects in preovulatory endometrium of normo-ovulating infertile women with minimal or mild endometriosis. *Fertil Steril* 53: 989.
- Feinman MA, Kliman HJ, Main EK, 1987. HLA antigen expression and induction by γ -interferon in cultured human trophoblasts. *Am J Obstet Gynecol* 157: 1429.
- Ferenczy A, 1976. Studies on the cytodynamics of human endometrial regeneration. I Scanning electron microscopy. *Am J Obstet Gynecol* 124: 64.
- Ferenczy A, Bertrand G and Gelfand MM, 1979. Proliferation kinetics of human endometrium during the normal menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 133: 859.
- Ferguson MM, McDonald FG, 1985. Oestrogen as an inhibitor of human NK cell cytotoxicity. *FEBS Lett* 191: 145.
- Fernandez-Shaw S, Hicks BR, Yudkin PL, Kennedy S, Barlow DH and Starkey PM, 1993. Antiendometrial and anti-endothelial autoantibodies in women with endometriosis. *Hum Reprod* 8:310.
- Ferry BL, Sargent IL, Starkey PM and Redman CWG, 1991. *Cell Immunol* 132: 140.
- Fukuoka M, Mori T, Taii S and Yasuda K, 1988. Interleukin-1 inhibits luteinization of porcine granulosa cells in culture. *Endocrinology* 122: 367.

Garzetti GG, Ciavattini A, Provinciali M, Fabris N, Cognitti M, Romanini C, 1993. Natural killer cell activity in endometriosis: correlation between serum estradiol levels and cytotoxicity. *Obstet Gynecol* 81: 665.

Gendron RL and Baines MG, 1988. Infiltrating decidual natural killer cells are associated with spontaneous abortion in mice. *Cell Immunol* 113: 261.

Gendron RL and Baines MG, 1989. Morphometric analysis of the histology of spontaneous foetal resorption in a murine pregnancy. *Placenta* 10: 309.

Gleicher N, Dmowski WP, Siegel I, 1984. Lymphocyte subsets in endometriosis. *Obstet Gynecol* 63:463.

Gleicher N and El-Roeiy A, 1988. The reproductive autoimmune failure syndrome (RAFS). *Am J Obstet Gynecol* 159: 223.

Gleicher N, El-Roeiy A, Confino E, Friberg J, 1987. Abnormal autoantibodies in endometriosis: is endometriosis an autoimmune disease? *Obstet Gynecol* 70:115.

Gosden RG, Hunter RH, Telfer E, Torrance C and Brown N, 1988. Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. *J Reprod Fertil* 82: 813.

Gottschall PE, Uehara A, Hoffmann ST and Arimura A, 1987. Interleukin-1 inhibits follicle-stimulating hormone-induced differentiation in rat granulosa cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 149: 502.

Griffin JD, Hercend T, Beveridge R, Schlossman SF, 1983. Characterization of an antigen expressed by human natural killer cells. *J. Immunol* 130: 2947.

Haas CG, Cinis DB and Schruber AD, 1980. Immunological infertility: Identification of patients with antisperm antibody. *N Engl J Med* 303: 722.

Haimovici F, Hill JA, Anderson DJ, 1992. Effect of soluble products of activated lymphocytes and macrophages on mouse blastocyst implantation in vitro.

Halme J, 1993. Immunology of endometriosis. Course I reproductive immunology: basic concepts and clinical practice AFS, 103.

Halme J, Becker S, Hammond MG, Raj HG, Raj S, 1983. Increased activation of pelvic macrophages in infertile women with mild endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 145:333.

Halme J, Becker S, Wing R, 1984. Accentuated cyclic activation of peritoneal macrophages in patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 148:85.

Halme J, Hammin MG, Hulka JF, Raj SG, Tolbert LM, 1984. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 64: 151.

Haney AF, Misukonis MA, Weinberg JB, 1983. Macrophages and infertility: oviductal macrophages as potential mediators of infertility. *Fertil Steril* 39:310.

Haney AF, Muscato JJ, Weinberg JB, 1981. Peritoneal fluid cell populations in infertility patients. *Fertil Steril* 35: 696.

Harel-Bellan A, Quillet A, Marchiol C, DeMars R, Tursz T and Fradelizi D, 1986. Natural killer susceptibility of human cells may be regulated by genes in the HLA region on chromosome 6. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 5688.

Healy DL, Trounson AO and Andersen AN, 1994. Female infertility: causes and treatment. *Lancet* 343: 1539.

Hemmings R, Lachapelle MH, Falcone T, Miron P, Ward L and Guyda H, 1994. Effect of follicular fluid supplementation on the in vitro development of human pre-embryo. *Fertil Steril* 62: 1018.

Herberman RB, Ortaldo JR, 1981. Natural killer cells: their role in defenses against disease. *Science* 214: 24.

Hersend T, Griffin JD, Bensussan A, Schmidt RE, Edson MA, Brennan A, Murray C, Daley JF, Schlossman SF, Ritz J, 1985. Generation of monoclonal antibodies to a human natural

killer clone: characterization of two natural killer associated antigens NKH1 and NKH2, expressed on subsets of large granular lymphocytes. *J. Clin Invest* 75: 932.

Hill JA, 1991. The rationale for leukocyte immunization in women with recurrent spontaneous abortion: Fact or fiction? In: Chaouat G, Mowbray J, eds. *Cellular and molecular biology of the materno-fetal relationship*. Paris: Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd, pp. 262-9.

Hill JA, 1992. Immunology and endometriosis. *Fertil Steril* 58: 262.

Hill JA, 1993. Immunology of recurrent spontaneous abortion. Course I reproductive immunology: Basic concepts and clinical practice AFS 161.

Hill JA and Anderson DJ, 1988. Immunological mechanisms of female infertility. *Baillere's Clin Immunol Allerg* 2: 551.

Hill JA, Barbieri RL, Anderson DJ, 1987. Detection of T8 (suppressor/cytotoxic) lymphocytes in human ovarian follicular fluid. *Fertil Steril* 47:114.

Hill JA, Haimovici F and Anderson DJ, 1987. Products of activated lymphocytes and macrophages inhibit mouse embryo development in vitro. *J Immunol* 139: 2250

Hill JA, Haimovici F, Schiff I, 1989. Reproductive antigens (sperm and trophoblast) stimulate the production of embryo and trophoblast toxic factors in women with recurrent spontaneous abortion. *Soc Gynecol Invest* 507.

Hill JA, Polgar K, Harlow BL, Anderson DJ, 1992. Evidence of embryo- and trophoblast-toxic cellular immune response(s) in women with recurrent spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol* 166: 1044.

Hill JA, Raviniker VA, 1990. Recurrent abortion. In: Ryan KJ (ed) *Gynecology: principles and practice*. New York: Year Book, pp. 406-30.

Huizinga TWJ, Roos D and van dem Borne AEGK, 1990. Neutrophil Fc- γ receptors: A two-way bridge in the immune system. *Blood* 75: 1211.

Hull ME, Moghissi KS, Magyar DF and Hayes MF, 1987. Comparison of different treatment modalities of endometriosis in infertile women. *Fertil Steril*; 47: 40.

Iddekinge BV, Hofmeyr GJ, Bezwoda WR, Wadee AA and Roy PV, 1993. Recurrent spontaneous abortion: Histocompatibility between partner, response to immune therapy, and subsequent reproductive performance. *Am J Reprod Immunol* 30: 37.

Isaacson KB, Galman M, Coutifaris C and Lyttle CR, 1990. Endometrial synthesis and secretion of complement component-3 by patients with and without endometriosis. *Fertil Steril* 53: 836.

Ishihara S, Taketane Y and Mizuno M, 1991. Endometriosis impairs glycogen synthesis in human endometrium. *Int J Fertil* 36: 287.

Iwasaki KI, Makino T, Maryama T, Matsubayashi H, Nozawa S, 1993. Leukocyte subpopulations and natural killer activity in endometriosis. *Int J Fertil* 38: 229.

Javert CT, 1951. Observations on the pathology and spread of endometriosis based on the theory of benign metastasis. *Am J Obstet Gynecol* 62: 477.

Jeannet M, Bishop P, Bourrit B and Vugnat P, 1985. Sharing of HLA antigens in fertile, subfertile and infertile couples. *Transplant Proc* 17: 903.

Jenkins S, Olive DL and Haney AF, 1986. Endometriosis: Pathogenetic implications of the anatomic distribution. *Obstet Gynecol* 67: 335.

Jensen PA and Stromme WB, 1972. Amenorrhea secondary to puerperal curettage. *Am J Obstet Gynecol* 113: 150.

Johnson PM, 1993. Immunobiology of the human placental trophoblast. *Exp Clin Immunogenet* 10: 118.

Jones WR, 1980. Immunologic infertility: Fact or fiction? *Fertil Steril* 33: 577.

Kamat BR and Isaacson PG, 1987. The immunocytochemical distribution of leukocytic subpopulations in human endometrium. *Am J Pathol* 127: 66.

Kasson BG and Gorospe WC, 1989. Effects of interleukin-1, 2 and 3 on follicle-stimulating hormone-induced differentiation of rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 62: 103.

Kaufman RH, Adam E and Binder GL, 1980. Upper genital tract changes and pregnancy outcome in offspring exposed in utero to diethylstilbestrol. *Am J Obstet Gynecol* 137: 299.

Kennedy SH, Sargent IL, Starkey PM, Hicks BR and Barlow DH, 1990a. Localization of anti-endometrial antibody binding in women with endometriosis using a double-labelling immunohistochemical method. *Br J Obstet Gynecol* 75:914.

Kennedy SH, Starkey PM, Sargent IL, Hicks BR and Barlow DH, 1990b. Anti-endometrial antibodies in endometriosis measured by an enzyme linked immunosorbent assay before and after treatment with danazol and nafarelin. *Obstet Gynecol* 75:914-19.

Kikuchi Y, Ishikawa N, Hirata J, Imaizumi E, Sasa H and Nagata I, 1993. Changes of peripheral blood lymphocyte subsets before and after operation of patients with endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 72: 157.

King A and Loke, 1990. *Cell Immunol* 129: 435.

King A and Loke YW, 1991. *Immunol Today* 12: 432.

King A, Wellings V, Gardner L and Loke YW, 1989. Immunocytochemical characterization of the unusual large granular lymphocytes in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Human Immunology* 24: 195.

Klentzeris LD, Bulmer JN, Tredosiewicz LK, Morrison L and Cooke ID, 1993. Beta-1 integrin cell adhesion molecules in the endometrium of fertile and infertile women. *Hum Reprod* 8: 1223.

Klentzeris LD, Bulmer JN, Warren A, Morrison L, Li TC and Cooke ID, 1992. Endometrial lymphoid tissue in the timed endometrial biopsy: morphometric and immunohistochemical aspects. *Am J Obstet Gynecol* 167: 667.

Klentzeris LD, Blumer JN, Warren MA, Morrison L, Li TC and Cooke ID, 1994. Lymphoid tissue in the endometrium of women with unexplained infertility: morphometric and immunohistochemical aspects. *Hum Reprod* 9: 646.

Kovast S, Main EK, Librach C, 1990. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* 248: 220.

Lachapelle MH, Hemming R, Roy DC, Falcon T and Miron P, 1996. Flow cytometric evaluation of leukocyte subpopulations in the follicular fluids of infertile patients. *Fertil Steril* 65: 1135.

Lachapelle MH, Miron P, Hemmings R, Baron C and Roy DC, 1996. Flow-cytometric characterization of hematopoietic cells in non-pregnant human endometrium. *Am J Reprod Immunol* 35:5.

Lachapelle MH, Miron P, Hemming R and Roy DC, 1996. Endometrial T, B and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion. *J Immunol* 156: 4027.

Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR and Phillips JH, 1986. The relationship of CD16 (LEU-11) and LEU-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunology* 136: 4480.

Lanier LL, Le AM, Phillips JH, Warner NL, Babcock GF, 1983. Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK015) antigens. *J Immunol* 131: 1789.

Lanier LL, Phillips JH, Hackett J, Tutt M, Kumar V, 1986. Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J. Immunol* 137: 2735.

Lanier LL, Testi R, Bindl J, Phillips JH, 1989. Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J. Exp Med* 69: 2233.

Lee MS, Ben-Rafael Z, Meloni F, Mastroianni L and Flickinger GL, 1987. Relationship of human oocyte maturity, fertilization and cleavage to follicular fluid prolactin and steroids. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 4: 168.

Leese HJ, Lenton EA, 1990. Glucose and lactate in human follicular fluid: concentrations and interrelationships. *Human Reprod* 5:915.

Lei ZM, Chegini N, Rao CHV, 1991. Quantitative cell composition of human and bovine corpora lutea from various reproductive states *Bio Reprod* 44:1148.

Leiva MA, Hasty LA, Pfeifer S, Mastroianni L and Lyttle CR, 1993. Increased chemotactic activity of peritoneal fluid in patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 168: 592.

Li C, Dockery P and Cooke ID, 1990. A quantitative study of endometrial development in the luteal phase: comparison between women with unexplained infertility and normal fertility. *Br J Obstet Gynaecol* 97: 576.

Lin H, Mosmann TR, Gilbert L, Tuntipopipit S and Wegman TG, 1993. Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *J Immunol* 151: 4562.

Linnemeyer PA and Pollack SB, 1991. *J Immunol* 147: 2530.

Lobo PI and Spencer CE, 1989. Use of anti-HLA antibodies to mask major histocompatibility complex gene products on tumor cells can enhance susceptibility of these cells to lysis by natural killer cells. *J Clin Invest* 83: 278.

Lopez BA, Newman GE, Phizackerley PJ, Laird E, Ross C, Barlow DH, 1992. Platelet-activating factor levels in human follicular and amniotic fluids. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 46:39.

Loukides JA, Loy RA, Edwards R, Honig J, Visintin I, Polan ML, 1990. Human follicular fluids contain tissue macrophages. *J Clin Endocrinol Metab* 71: 1363.

Macchia D, Almerigogna F, Parronchi P, Ravina A, Maggi E and Romagnani S, 1993. Membrane tumor necrosis factor-alpha is involved in the polyclonal B-cell activation induced by HIV-infected human T cells. *Nature*, 363: 464.

Maccio A, Mantovani G, Turnu E, Artini P, Contu G, Serri FG and Volpe A, 1993. Evidence that granulosa cells inhibit interleukin-1 alpha and interleukin-2 production from follicular lymphomonocytes. *J Ass Reprod & Gene* 10: 517.

Mahmood TA, Arumugam K and Templeton AA, 1991. Oocyte and follicular fluid characteristics in women with mild endometriosis. *Br J Obstet Gynecol* 98: 573.

Maier DB, Parke A, 1989. Subclinical autoimmunity in recurrent aborters. *Fertil Steril* 51: 280.

March CM, 1991. Recurrent abortion. In *Infertility, Contraception & Reproductive Endocrinology*. Third Edition, Blackwell Scientific Publication, Boston pp. 776.

Marcus ZH, Soffer Y, Ben-David A, Peleg S and Nebel L, 1973. Studies on sperm antigenicity: Delayed hypersensitivity to spermatozoa. *Eur J Immunol* 3: 75.

Martin PJ, 1992. Determinants of engraftment after allogeneic marrow transplantation. *Blood* 79: 1647.

Maruyama T, Makino T, Sugi T, Iwasaki KI, Ozaxa N, Matsubayashi H and Nozawa S, 1993. Flow cytometric crossmatch and early pregnancy loss in women with a history of recurrent spontaneous abortion who underwent paternal leukocyte immunotherapy. *Am J Obstet Gynecol* 168: 1528

Masahashi T, Matsuzawa K, Ohsawa M et al., 1988. Serum Ca 125 levels in patients with endometriosis: Changes in Ca 125 levels during menstruation. *Obstet Gynecol* 72: 328.

Mathur S, Garza DE and Smith LF, 1990. Endometrial autoantigens eliciting immunoglobulin (Ig)G, IgA, and IgM responses in endometriosis. *Fertil Steril* 54:56.

Mathur S, Peress MR, Williamson HO, Youmans CD, Maney SA, Garrin AJ, Rust PF, Fudenberg HM, 1992. Autoimmunity to endometrium and ovary in endometriosis. *Clin Exp Immunol*, 50, 259.

McIntyre JA, Faulk WP, Nichols-Johnson V and Taylor CG, 1986. Immunologic testing and immunotherapy in recurrent spontaneous abortion. *Obstet Gynecol* 67: 169.

McLachlan JA, Nelson KG, Takahashi T, Bossert NL, Newbold RR and Korach KS, 1991. Do growth factors mediate estrogen action in the uterus? in *The new biology of steroid hormones*. Hochberg RB & Naftolin F Eds, Raven Press, New York vol. 74 pp.337.

McShane PM, Schiff I and Trentham D, 1985. Cellular immunity to sperm in infertile women. *JAMA* 253: 3555.

Melamed MR, Lindmo T and Mendelsohn ML, 1990. *Flow-cytometry and sorting*, second ed., New York: Wiley-Liss.

Menze Ac, 1970. Immune reactions and infertility. *J Reprod Fertil Suppl* 10: 171.

Mettler L and Schirwani D, 1975. Macrophage migration inhibitory factor in female sterility. *Am J Obstet Gynecol* 121: 117.

Mishell DR and Davajan V, 1991. Evaluation of the infertile couple. In *Infertility, Contraception & Reproductive Endocrinology*. Third Edition, Blackwell Scientific Publication, Boston pp. 557.

More IAR, Armstrong EM, McSeveney D and Chatfield WR, 1974. The morphogenesis and fate of the nucleolar channel system in the human endometrial glandular cell. *J Ultrastruct Res* 47: 74.

Mosher WD and Pratt WF, 1982. Fecundity, infertility and reproductive health in the United States. In Vital and Health Statistics Series Service, Washinton, D.c., U.S. Printing Office

Mosmann TR, Cherwinski H, Bomd MW, Giedlin MA and Coffman RL, 1986. Two types of murine helper T cell clone. *J Immunol*, 136: 2348.

Mowbray JF, Underwood JL, Michel M, Forbes PB and Beard RW, 1987. Immunization with paternal lymphocytes in women with recurrent miscarriage. *Lancet* 2: 679.

Munday PE, Porter R and Falder PF, 1984. Spontaneous abortion: An infections aetiology? *Br J Obstet Gynaecol* 91:1177.

Murphy AA, Green WR, Bobbie D et al., 1986. Unsuspected endometriosis documented by scanning electron microscopy in visually normal peritoneum. *Fertil Steril* 46: 522.

Muse KN and Wilson EA, 1982. How does mild endometriosis cause infertility? *Fertil Steril* 38: 145.

Nabel C, 1984. Malimplantation: a cause of failure after IVF and ET. *AM J Reprod Immunol* 6: 56.

Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH, 1989. Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol* 143: 3181.

- Nagler A, Lanier LL, Phillips JH, 1990. Constitutive expression of high affinity interleukin-2 receptors on human CD16-natural killer cells in vivo. *J Exp Med* 171: 1527.
- Naples JD, Batt RE and Sadigh H, 1981. Spontaneous abortion rate in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 57: 509.
- Nelson KG, Takahashi T, Lee DC, Luetkeke NC, Bossert NL, Ross K, Eitzman BE and McLachlan JA, 1992. Transforming growth factor- α is a potential mediator of estrogen action in the mouse uterus. *Endocrinology* 131: 1657.
- Norman RJ, Wang LJ, 1991. Tumor necrosis factor A immuno-activity in human follicular fluid and its effects on human granulosa-lutein cells. 34th Annual Scientific Meeting, The Endocrine Society of Australia Proceedings 1991, Sydney, Australia, p.91.
- Norwitz ER, Starkey PM, Lopez Bernal A and Turnbull AC, 1991. Identification by flow-cytometry of the prostaglandin-producing cell populations of term human decidua. *J Endocrinol* 131: 327.
- Noyes RW, Herting AT and Rock J, 1950. Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* 1: 3.
- Oksenberg JR, Brautbar C, 1986. In vitro suppression of murine blastocysts growth by sera from women with reproductive disorders. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 11: 118.

Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR, 1991. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril* 56: 45.

Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR, 1992. The natural killer activity of peritoneal fluid lymphocytes is decreased in women with endometriosis. *Fertil Steril* 58: 290.

Ota H, Igarashi S, 1993. Expression of major histocompatibility complex class II antigen in endometriotic tissue in patients with endometriosis and adenomyosis. *Fertil Steril* 60:834.

Ozer H, Strelkauskas AJ, Callery RT, Schlossman SF, 1979. The functional dissection of human peripheral blood null cells with respect to cytotoxicity and natural killing. *Eur J Immunol* 9: 112.

Pace D, Morrison L and Bulmer JN, 1989. *J Clin Pathol* 42: 35.

Paul WE, Seder RA, 1994. Lymphocytes responses and cytokines. *Cell*, 76: 241.

Perussia B, Acuto O, Terhorst C, Faust J, Lazarus R, Fanning V, Trinchieri G, 1983a. Human natural killer cells analyzed by B73.1 a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions: II. Studies of B73.1 antibody-antigen interactions on the lymphocyte membrane. *J Immunol* 130: 2142.

Perussia B, Starr S, Abraham S, Fanning V, Trinchieri G, 1983b. Human natural killer cells analyzed by B73.1. a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions: 1 characterization fo the lymphocyte subset reactive with B73.1. *J Immunol* 130: 2133.

Pittaway DE, Fayez JA, 1986. The use of CA-125 in the diagnosis and management of endometriosis. *Fertil Steril* 46:790.

Pring WW, 1979. Sperm antibody activity in human fallopian tube fluid. *Fertil Steril* 32: 676.

Pross HF, Callewaert D and Rubin P, 1986. Assays for NK cell cytotoxicity: Their values and pitfalls. In *Immunobiology of Natural Killer cells*, vol 1, Lotzova E. Herberman RB eds, Boca Raton pp.2.

Provincial M, Fabris N, 1991. Models and mechanisms of neuroendocrine-immune interactions during ontogeny. *Adv Neuroimmunol* 1: 124.

Punnonen J, Heinonen PK, Teisala K, Kujansuu E, Jansen CT, Punnonen R, 1992. Demonstration of tumor necrosis factor- α in preovulatory follicular fluid: its association with serum 17 β -estradiol and progesterone. *Gynecol Obstet Invest* 33:80.

Radawanska E and Dmowski WP, 1981. Luteal function in infertile women with endometriosis. *Infertility* 4: 269.

Rahn J, 1968. On the nosological evaluation of infiltrates of the human endometrium. *Gegenbaurs. Morphol Jahrb* 111: 605.

Reymolds CW, Ward JM, 1986. Tissue and organ distribution of NK cells. In Lotzova E, Herberman RB (eds): *Immunobiology of natural killer cells*, vol. 1, Boca Raton, FL, CRC 63.

Rier SE, Martin DC, Bowman RE, Dmowski WP and Becker JL, 1993. Endometriosis in Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following chronic exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Fundamental and applied toxicology* 21:433.

Ritson A and Bulmer JN, 1987. Endometrial granulocytes in human decidua react with a natural-killer (NK) cell marker. *Immunology* 62: 329.

Ritz J, Schmidt RE, Michon J, Hercend T, Schlossman SF, 1988. Characterization of functional surface structures on human natural killer cells. *Adv Immunol* 42: 181.

Robertson MJ, Caligiuri MA, Manley TJ, Levine H, Ritz J, 1990. Human natural killer cell adhesion molecules. *J. Immunol* 145: 3194.

Robertson MJ and Ritz J, 1990. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 76: 2421.

Rocklin RE, Kitzmiller JL, Carpenter CB, Garvey MR, DAvid JR, 1976. Maternal-fetal relation: absence of an immunologic blocking factor from serum of women with chronic abortions. *N Engl J Med* 295: 1209.

Rodger JC, 1985. Lack of a requirement for a maternal humoral immune response to establish and maintain successful allogenic pregnancy. *Transplantation* 40: 372.

Rodrigo Guerrero V and Rojas OI, 1975. Spontaneous abortion and aging of human ova and spermatozoa. *N Engl J Med* 293: 573.

Rowland A, Baird DD, Weinberg CR, Shore DL, Shy CM and Wilcox AJ, 1992. Reduced fertility among women employed as dental assistants exposed to high levels of nitrous oxide. *N Engl J Med* 327: 993.

Roy DC, Tantravahi R, Murray C, Dear K Gorgone B and Anderson KC, 1990. Natural history of mixed chimerism after bone marrow transplantation with CD6-depleted allogeneic marrow: a stable equilibrium. *Blood* 75: 296.

Russell WW, 1899. Aberrant portions of the mullerian duct found in an ovary: Ovarian cysts of mullerian origin. *Bull Johns Hopkins Hosp* 10: 8.

Saito S, Morii T, Enomoto M, Sakakura S, Nishikawa K, Narita N and Ichijo M, 1993. The effect of interleukin-2 and transforming growth factor- β 2 (TGF- β 2) on the proliferation and

- natural killer activity of decidual CD16-CD56bright natural killer cells. *Cellular Immunology* 152: 605.
- Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K, Masuda T, 1985. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. *J Exp Med* 161:72.
- Sampson JA, 1927. Peritoneal endometriosis, due to menstrual dissemination of endometrial tissue into peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 14: 422.
- Sargent IL, Wilkins T, Redman CWG, 1988. Maternal immune responses to the fetus in early pregnancy and recurrent miscarriage. *Lancet* 2: 1099.
- Sato S, Kanzaki H, Oshida M, Tokushige M, Wang HS, Kariya M, Okamoto N, Kariya Y, Uchida A, Kasakura S and Mori T, 1990. Studies on T-lineage cells in human decidua of first trimester pregnancies. *Am J Reprod Immunol* 24: 67.
- Schenker JG and Margalioth EJ, 1982. Intrauterine adhesion: An updated appraisal. *Fertil Steril* 37: 593.
- Schmidt CC, 1985. Endometriosis: a reappraisal of pathogenesis and treatment. *Fertil Steril* 44: 157.
- Schmidt RE, Murray C, Daley JF, Schlossman SF, Ritz J, 1986. A subset of natural killer cells in peripheral blood displays a mature T cell phenotype. *J Exp Med* 164:351.

Scott JR, Rote NS and Branch DW, 1987. Immunologic aspects of recurrent abortion and fetal death. *Obstet Gynecol* 70: 645.

Semino C, Semino A, Pietra G, Mingari MC, Barocci S, Venturini PL, Ragni N and Melioli G, 1995. Role of major histocompatibility complex class I expression and natural killer-like T cells in the genetic control of endometriosis. *Fertil Steril* 64: 909.

Shivers CA and Dunbar BS, 1977. Autoantibodies to zona pellucida: A possible cause for infertility in women. *Science* 197: 1082.

Simpson JL, Elias S, Malinak LR and Buttram VC, 1980. Heritable aspects of endometriosis. I Genetic studies. *Am J Obstet Gynecol* 137: 327.

Skakkebaek NE, Giwercman A and Kretser DM, 1994. Pathogenesis and management of male infertility. *Lancet* 343: 1473.

Soffer Y, Marcus ZH and Nebel L, 1976. Reactions leucocytaires in vitro aux spermatozoides humains chez des femmes infertiles. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 5: 621.

Spuijbroek MDE, Dunselman GAJ, Menheere PPCA and Evers JLH, 1992. Early endometriosis invades the extracellular matrix. *Fertil Steril* 58:929.

Starkey PM, Sargent IL and Redman CWG, 1988. Cell populations in human early pregnancy decidua: characterization and isolation of large granular lymphocytes by flow cytometry. *Immunology* 65: 129.

Starseva NV, 1980. Clinico-immunological aspects in genital endometriosis. *Akush gynecol* 3:23.

Steele RW, Dmowski WP, Marmer DJ, 1984. Immunologic aspects of human endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 6: 33.

Stern JJ and Coulam CB, 1993. Current status of immunologic recurrent pregnancy lost. *Current opinion in Obstet & Gynecol* 5: 252.

Storkus WJ, Howell DN, Salter RD, Dawson JR and Cresswell P, 1987. NK susceptibility varies inversely with target cell class I HLA antigen expression. *J Immunol* 138: 1657.

Stray-Pederson B and Stray-Pederson S, 1984. Etiologic factors and subsequent reproductive performance in 195 couples with a prior history of habitual abortion. *Am J Obstet Gynecol* 148: 140.

Subramanian MG, Sacco AG, Moghissi KS, 1988. Human follicular fluid: Prolactin is biologically active and ovum fertilization correlates with estradiol concentration. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 5: 129.

Suginami H, Yano K, Watanake K, Matsura S, 1986. A factor inhibiting ovum capture by the oviductal fimbriae present in endometriosis peritoneal fluid. *Fertil Steril*, 46: 1140.

Suginami H, Yano K, 1988. An ovum capture inhibitor (OCI) in endometriosis peritoneal fluid: an OCI-related membrane responsible for fimbrial failure of ovum capture. *Fertil Steril* 50: 648.

Sugita K, Sendo F, Kawagoe S, Hiroi M, 1992. Decreased natural killer cell activity in women with endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 34: 27.

Tabibzadeh SS, 1991. Distinct subsets of stromal cells confined to unique microenvironments in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Am J Reprod Immunol* 26: 5.

Tabibzadeh SS and Satyaswaroop PG, 1989. Sex steroid receptors in lymphoid cells of human endometrium. *Am J Clin Pathol* 91: 656.

Tanaka E, Sendo F, Kawagoe S and Hiroi M, 1992. Decreased natural killer cell activity in women with endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 34: 27.

Telimaa S, Kauppila A, Ronnberg L, Suikkari A, Seppala M, 1989. Elevated serum levels of endometrial secretory protein PP14 in patients with advanced endometriosis: suppression by

treatment with danazol and high-dose medroxyprogesterone acetate. *Am J Obstet Gynecol*, 161, 866.

The American Fertility Society, 1985. Revised American Fertility Society classification of endometriosis. *Fertil Steril*, 43, 351.

Thiagarajan P, Shapiro SS, DeMarco L, 1980. Monoclonal immunoglobulin M coagulation inhibitor with phospholipid specificity-mechanism of a lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 66: 397.

Timonen T, Ortaldo J, Herberman RB, 1981. Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cells. *J Exp Med* 153: 569.

Timonen T, Saksela E, 1980. Isolation of human NK cells by density gradient centrifugation. *J Immunol Methods* 36: 285.

Tindall VR, 1987. *Jeffcoate's Principles of Gynaecology*. Fifth edition. Butterworths publishers.

Trinchieri G, 1989. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 47:187.

Triplet DA, Brandt JT, Musgrave KA and Orr CA, 1988. The relationship between lupus anticoagulants and antibodies to phospholipid. *JAMA* 259: 550.

Tummon IS, Maclin VM, Radwanska E, Binor Z and Dmowski WP, 1988. Occult ovulatory dysfunction in women with minimal endometriosis and unexplained infertility. *Fertil Steril* 50: 716.

Unander AM and Lindholm A, 1986. Transfusions of leukocyte rich erythrocyte "concentrates": A successful treatment in selected cases of habitual abortion. *Am J Obstet Gynecol* 154: 516.

Unkeless JC, 1989. Function and heterogeneity of human Fc receptors for immunoglobulin G. *J Clin Invest* 83: 355.

van Iddekinge B, Hofmeyr GJ, Bezwoda WR, Wadee AA, Roy PV, 1993. Recurrent spontaneous abortion: histocompatibility between partners, response to immune therapy, and subsequent reproductive performance. *Am J Reprod Immuno.* 30: 37.

Vigano P, Vercellini P, Di Blasio AM, Colombo A, Candiani GB, Vignali M, 1991. Deficient antiendometrium lymphocyte-mediated cytotoxicity in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 56:894.

Vince GS, Starkey PM, Jackson MC, Sargent IL and Redman CWG, 1990. Flow cytometric characterisation of cell populations in human pregnancy decidua and isolation of decidual macrophages. *J Immunol Methods* 132: 181.

Wah RM, Anderson DJ and Hill JA, 1990. Asymptomatic cervicovaginal leukocytosis in infertile women. *Fertil Steril* 54: 445.

Wang H-S, Kanzaki H, Yoshida M, Sato S, Tokushige M, Mori T, 1987. Suppression of lymphocyte reactivity in vitro by supernatants of explants of human endometrium. *Am J Obstet Gynecol* 157: 956.

Wang LJ, Norman RJ, 1992. Concentrations of immunoreactive interleukin-1 and interleukin-2 in human preovulatory follicular fluid. *Human Reprod* 7:147.

Warburton D and Fraser FC, 1964. Spontaneous abortion risks in man: Data from reproductive histories collected in a medical genetics unit. *Am J Hum Genet* 16:1.

Weed JC and Arguembourg PC, 1980. Endometriosis: can it produce an autoimmune response resulting in infertility? *Clin Obstet Gynecol* 23:885.

Wegmann TG, 1988. Maternal T cells promote placental growth and prevents spontaneous abortion. *Immunol Letters* 17:297.

Westergaard LG, Anderson Cy, 1989. Epidermal growth factor EGF in human preovulatory follicles. *Hum Reprod* 3: 257.

Williamson EM and Miller JF, 1980. A prospective study into early conceptual loss. *Clin Genet* 17: 93.

Wingfield M, Macpherson A, Healy DL and Rogers PAW, 1995. Cell proliferation is increased in the endometrium of women with endometriosis. *Fertil Steril* 64: 340.

Winston RML, 1993. *Infertility*. Martin Dunitz Ltd, London.

Xu C, Hill JA and Anderson DJ, 1987. Identification of T lymphocyte subpopulations in normal and abnormal human endometrial biopsies. (Abstr. 342) Presented at the Fifth Annual Meeting of the Society for Gynecologic Investigation, Atlanta, Georgia.

Yokoyama M, Sano M, Sonoda K, Nozaki M, Nakamura G-I and Nakano H, 1994. Cytotoxic cells directed against placental cells detected in human habitual abortions by an in vitro terminal labeling assay. *Am J Reprod Immunol* 31: 197.

Zawin M, McCarthy S, Scoutt L and Comite F, 1989. Endometriosis: Appearance and detection at MR imaging. *Rdiology* 171: 693.

Zigril M, Fein A, Carp H and Toder V, 1991. Immunopotentialiation reverses the embryotoxic effect of serum from women with pregnancy loss. *Fertil Steril* 56: 653.