

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique  
Université Blida -1-  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département Biologie et Physiologie Cellulaire



**Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master**  
**Option « Génétique physiologie »**

**Etude de la fréquence allélique des antigènes HLA  
classe I et II chez une population Algérienne saine**

**Présenté par :**

**M<sup>lle</sup> Sidi Moussa Hanane**

**Devant le jury :**

<b>Mr Ben Yahia</b>	<b>MAA</b>	<b>(UB1)</b>	<b>Président</b>
<b>Mme Aissani</b>	<b>MAA</b>	<b>(UB1)</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>Mme Allam</b>	<b>MAA</b>	<b>(CHU Béni Messous)</b>	<b>Promotrice</b>
<b>Mr Bessaad</b>	<b>MCB</b>	<b>(UB1)</b>	<b>Co-promoteur</b>
<b>Mr Brahim Errahmani</b>	<b>MAA</b>	<b>(UB1)</b>	<b>Invité</b>

**Année universitaire : 2014 - 2015**

# Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

**Introduction**.....1

## **Synthèse bibliographique**

### **Chapitre 1 : Le système HLA**

1- Historique.....	2
2- Définition du système HLA .....	2
3- Structure générale du système HLA.....	3
3-1- HLA classe I.....	3
3-2- HLA classe II.....	4
3-3- HLA classe III.....	4
4- Organisation génétique et structure moléculaire.....	4
4-1- Gènes et molécules de classe I.....	5
4-2- Gènes et molécules de classe II .....	6
5- Caractères principaux du système HLA.....	7
5-1- Le polymorphisme.....	7
5-2- L'expression codominante.....	7
5-3- Le déséquilibre de liaison.....	8
6- Les inconvénients du polymorphisme.....	9

### **Chapitre 2 : Nomenclature et dénombrement des allèles HLA**

1- La nomenclature HLA.....	9
2- Nomenclature des allèles HLA.....	10
3- Dénombrement des allèles HLA .....	12

### **Chapitre 3 : HLA et population**

1- Utilité du système HLA dans la génétique des populations.....	15
2- Etude du polymorphisme HLA chez les Maghrébins.....	15

## **Chapitre 4 : Méthodes d'études du système HLA**

1- Technique sérologique par micro-lymphocytotoxicité .....	16
2- Méthodes de biologie moléculaire.....	16
3- La technique PCR-SSP (Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Primers).....	16
3-1- Définition .....	16
3-2- La découverte de la PCR-SSP.....	17
3-3- Avantages et inconvénients .....	17

### **Matériels et méthodes**

1- Matériels.....	19
1-1- Echantillonnage.....	19
1-2- Appareillage.....	20
2- Méthodes.....	20
2-1. Extraction de l'ADN par salting out.....	20
2-1-1- Principe.....	20
2-1-2- Mode opératoire.....	20
2-2- Détermination de la concentration de l'ADN .....	22
2-3- Amplification par PCR-SSP.....	23
2-3-1- Le principe de la technique.....	23
2-3-2- Les acteurs d'une réaction de PCR-SSP .....	23
2-3-3- Les amorces spécifiques d'allèles.....	24
2-3-4- Le contrôle interne .....	24
2-3-5- Présentation des kits de typage <i>Olerup</i> SSP.....	24
2-3-6- Réalisation d'un typage HLA SSP.....	25
2-4- Révélation de l'ADN amplifié sur gel d'agarose.....	27
2-4-1- Préparation des réactifs .....	27
2-4-2- Réalisation de la technique.....	27
2-4-3- Interprétation des résultats.....	28
2-5- Etude statistique .....	29

### **Résultats et discussion**

1-Résultats.....	31
1-1- Résultats du typage HLA.....	31
1-2- Fréquences alléliques .....	33

1-3- Relations génétiques.....	35
1-3-1- Comparaison des fréquences alléliques sur la base du locus HLA-A...	36
1-3-2- Comparaison des fréquences alléliques sur la base du locus HLA-B...	37
1-4- Analyse en composantes principales (ACP) .....	42
1-4-1- ACP basée sur les distributions des différents allèles .....	42
1-4-2- ACP basée sur les distributions des allèles HLA-A.....	43
1-4-3- ACP basée sur les distributions des allèles HLA-B.....	44
1-4-4- ACP basée sur les distributions des allèles HLA-DR.....	45
2- Discussion.....	46
2-1- Fréquences alléliques .....	46
2-2- Relations génétiques.....	48
2-2-1- Relations génétiques avec les populations Maghrébines.....	48
2-2-2- Relations génétiques avec les populations de l'Europe occidentale.....	49
2-2-3- Relations génétiques avec les populations lointaines.....	50
2-3- Analyse en composante principale (APC).....	50
2-4- HLA et greffe de moelle .....	51
2-5- Association HLA-Maladies .....	51
<b>Conclusion</b> .....	<b>53</b>

## **Références bibliographiques**

## **Annexes**

# Remerciement

Je remercie tous d'abord le bon Dieu de m'avoir aidé à réaliser ce modeste travail

Mes sincères remerciements vont s'adresser à :

Mon encadreuse, Docteur Allam, maitre assistante en immunologie, à l'hôpital Issad Hassani-Béni Messous, d'avoir accepté de diriger ce travail, et qui m'a donné la force, le courage et la patience.

A mon co-promoteur Mr Bessaad, Maitre de conférences B, pour ces critiques, ces conseils et sa patience pendant la réalisation de ce travail.

Une immense Merci à Mr Ben Yahia d'avoir bien voulu présidé le jury.

Je remercie profondément Mme Aissani d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je remercie le professeur Djidjik, chef de service d'immunologie médicale, de m'avoir ouvert les portes de son service à fin de réaliser ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et mon profond respect pour Mr Brahim Errahmani pour son orientation et son aide précieuse pendant la réalisation de ce travail.

Je remercie, tous le personnel du service d'immunologie médicale et particulièrement, le personnel de l'unité d'histocompatibilité, Lylia et Nesrine pour leur présence, bon humeur, et aide précieuse, je tiens à leur souhaiter plein de réussite dans leur parcours.

# *Dédicace*

*Aux deux personnes qui me sont les plus  
chères, mes parents, pour leur amour, leur patience  
et encouragements qu'ils m'ont offert durant toute ma vie.*

*A mes frères et mes sœurs*

*A tous les personnes qui m'aiment  
et espèrent voire mon bonheur ... ..*

## **Résumé**

Le système immunogénétique humain leukocyte antigen (HLA) fait partie d'un ensemble génétique complexe situé sur le bras court du chromosome 6. Il s'agit d'un système multigénique, multiallélique, utilisé souvent dans une perspective anthropologique en tant que marqueur génétique pour l'analyse des populations. A ce propos, notre travail vise à étudier la distribution alléliques des antigènes HLA-A, -B, -C, -DR et DQ par la technique de biologie moléculaire PCR-SSP sur un échantillon de 271 individus Algériens sains résidants dans différents régions. Les allèles les plus fréquemment rencontrées dans la population Algérienne sont les suivants : HLA-A\*02 (21.5%), -B\*50 (10.1%), -C\*07 (19.7%), -DRB1\*03 (19.13%) et -DQB1\*02 (32.85%). La comparaison de nos résultats avec les autres populations montre que les algériens sont ethniquement très proches des Maghrébins et de certains Européens, et aide à utiliser la génétique pour décrire la diversité au sein des différentes populations. De plus, ces données développent les connaissances actuelles sur la construction génétique des algériennes qui servira de référence pour le maintien d'une base de données pour la recherche de donneurs compatibles entre les algériens et les autres maghrébins, et pour les études d'association HLA- maladie.

**Mots clés:** Polymorphisme HLA, Fréquence allélique, Relation génétique, PCR-SSP.

## **Abstract:**

The immunogenetics system, human leukocyte antigen (HLA) is part of a genetic complex localized in humans on the short arm of chromosome 6, It is a multigenic multiallelic system often used in an Anthropological perspective as genetic marker for populations analysis. About that, our work vis study the allelic and haplotypic distribution of HLA-A, -B, -C, -DR and DQ antigens, by polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP) in 271 healthy individuals originating from different regions. The most frequent allele groups detected were ; HLA-A\*02 (21.5%), -B\*50 (10.1%), -C\*07 (19.7%), -DRB1\*03 (19.13%) et -DQB1\*02 (32.85%). Comparisons with data of other worldwide populations shows that the Algerians are ethnically very close to the North Africans and some Europeans and assistance in using genetics to describe the diversity of different populations , Moreover, these data develop the current knowledge of the genetic construct of Algerians which will maintaining a database for finding compatible donors between Algerian and other North Africans, and will serve this data as reference for HLA and disease association studies .

**Key words:** HLA polymorphism, Allele frequencies, Genetic relationships, PCR-SSP.



## ملخص

ينتمي نظام المناعة الوراثية مستضد الكريات البيض الى المجموعة الوراثية المعقدة المتواجدة عند البشر على مستوى الذراع القصير للكروموزوم 6 . يعتبر نظاما متعدد الجينات, متعدد الاليات يستخدم غالبا في وجهة نظر أنثروبولوجية باعتباره كعلامة وراثية لدراسة و تحليل السكان

و في هذا الصدد , قمنا بدراسة توزيع الأليات لمولدات الضد- A-HLA ، -B ، -C ، -DR ، وDQ بواسطة تقنية البيولوجيا الجزيئية PCR-SSP على 271 فرد سليم. جزائريين الأصل, مقيمين في مناطق مختلفة . الاليات الأكثر تكرارا في مجتمعنا هم : (19.13%) \* 03 -DRB1 , (32.85%) \* 02 DQB1 , (21.5 %) \* 02 HLA-A , (10.1%) \* B HLA , (19.7 %) \* 07 -C . مقارنة نتائجنا مع اعمال مماثلة, تبين ان الجزائريين هم أقرب عرقيا الى سكان المغرب العربي بالإضافة إلى بعض الأوروبيين, و تساعد على فهم التنوع الجيني للجماعات البشرية. بالإضافة إلى هذا, تمكن نتائجنا من تطوير المعلومات الحالية عن التركيب الوراثي للجزائريين الذي يعتبر بمثابة مرجع للحفاظ على وجود قاعدة بيانات بهدف البحث على متبرعين بالأنخاع العضمي متوافقين وراثيا بين الجزائر و المغرب العربي و لدراسة العديد من الأمراض المتعلقة بالنظام المناعي.

PCR-SSP , تردد الاليات , تعدد الأشكال , العلاقة الوراثية

# Listes des figures

<b>Figure N°01 :</b> Cartographie de la région HLA sur le chromosome 6 humain.....	3
<b>Figure N°02 :</b> Structure génomique du CMH I humain.....	3
<b>Figure N°03:</b> Structure génomique du CMH II humain.....	4
<b>Figure N°04 :</b> Structure génomique du CMH III humain.....	4
<b>Figure N°05 :</b> Gènes et molécules HLA classe I .....	5
<b>Figure N°06 :</b> Gènes et molécules HLA classe II.....	6
<b>Figure N°07 :</b> Transmission familiale des haplotypes human leukocyte antigène.....	8
<b>Figure N°08 :</b> Exemple de déséquilibre de liaison .....	9
<b>Figure N°09 :</b> Graphique montrant le nombre d'allèles nommés par année de 1987 à la fin de juin 2015.....	12
<b>Figure N°10 :</b> Principe de la PCR-SSP.....	17
<b>Figure N°11 :</b> Les principales étapes de la technique de salting out.....	22
<b>Figure N°12 :</b> Etapes de pré-amplification et amplification de l'ADN génomique par PCR SSP.....	26
<b>Figure N°13 :</b> Interprétation des résultats.....	28
<b>Figure N°14 :</b> Lecture des bandes sur le gel d'électrophorèse.....	28
<b>Figure N°15:</b> Schéma récapitulatif des méthodes effectuées au cours du stage expérimentale.....	30
<b>Figure N°16:</b> Visualisation des bandes sur le gel d'électrophorèse après amplification....	31
<b>Figure N°17:</b> Résultats du typage des antigènes HLA par biologie moléculaire « PCR-SSP » Biotest .....	32
<b>Figure N°18 :</b> ACP tenant compte la distribution des différents allèles HLA par pays....	42
<b>Figure N°19 :</b> ACP tenant compte la distribution des allèles HLA-A par pays.....	43
<b>Figure N°20 :</b> ACP tenant compte la distribution des allèles HLA-B par pays.....	44
<b>Figure N°21 :</b> ACP tenant compte la distribution des allèles HLA- DRB1 par pays.....	45

# Liste des tableaux

<b>Tableau N°01</b> : Nomenclature des allèles HLA .....	11
<b>Tableau N°02</b> : Nombre des allèles HLA .....	13
<b>Tableau N°03</b> : Nombre des allèles HLA classe I.....	13
<b>Tableau N°04</b> : Nombre des allèles HLA classe I - pseudogènes .....	13
<b>Tableau N°05</b> : Nombre des allèles HLA classe II .....	14
<b>Tableau N°06</b> : Nombre des allèles HLA classe II - DRB.....	14
<b>Tableau N°07</b> : Guide de résolution des problèmes du typage HLA.....	18
<b>Tableau N°08</b> : Les volumes à préparer en fonction du nombre des tubes PCR.....	25
<b>Tableau N°09</b> : Programme d'amplification.....	26
<b>Tableau N°10</b> : Fréquence des allèles HLA-A, -B et -C observées en Algérie (271 patients typés par PCR-SSP).....	33
<b>Tableau N°11</b> : Fréquence des allèles HLA-DR et -DQ observées en Algérie (271 patients typés par PCR-SSP).....	34
<b>Tableau N°12</b> : Exemples de fréquences alléliques (Human Leucocyte Antigen HLA-A) observées chez des populations différents.....	36
<b>Tableau N°13</b> : Exemples de fréquences alléliques (Human Leucocyte Antigen HLA-B) observées chez des populations différents.....	37
<b>Tableau N°14</b> : Exemples de fréquences alléliques (Human Leucocyte Antigen HLA-DR) observées chez des populations différents.....	38
<b>Tableau N°15</b> : Comparaison entre la population Algérienne et autres populations, basée sur la fréquence des allèles HLA-A.....	39
<b>Tableau N°16</b> : Comparaison entre la population Algérienne et autres populations, basée sur la fréquence des allèles HLA-B.....	41

# Liste des abréviations

<b>ADN :</b>	Acide Desoxy-reboNucléique
<b>ACP :</b>	Analyse en Composantes Principale
<b>Ag :</b>	Antigène
<b>BEt :</b>	Bromure d'Ethéduim
<b>β2m :</b>	β 2 microglobine
<b>CD4 :</b>	Cluster de Différenciation 4
<b>CMH :</b>	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
<b>CYP :</b>	Cytochrome P
<b>DL :</b>	Déséquilibre de Liaison
<b>DO :</b>	Densité Optique
<b>dNTP :</b>	dèsoxy-Nucléotide-Tri-Phosphate
<b>EDTA:</b>	Ethylène Diamine Tétracétique Acide
<b>GR:</b>	Globules Rouge
<b>GB:</b>	Globules Blanc
<b>HGH:</b>	Human Growth Hormone
<b>H2 :</b>	Histocompatibilité 2
<b>Hcl :</b>	chlorure d'Hydrogène
<b>HLA :</b>	Humain Leucocyte Antigène
<b>HSP:</b>	Heat Shock Proteins
<b>Ig :</b>	Immunoglobuline
<b>MgCl2:</b>	Chlorure de Magnésium
<b>NaCl:</b>	Chlorure de sodium
<b>OMS :</b>	Organisation Mondiale de la santé
<b>PCR-SSP :</b>	Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Primers
<b>PCR-SSO :</b>	Polymerase Chain Reaction Sequence Specific oligonucleotides
<b>PH :</b>	Potentiel Hydrogène
<b>PK :</b>	Protéinase K
<b>RFLP :</b>	Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction
<b>SSO :</b>	Sequence-Specific Oligonucleotide primed
<b>SBT :</b>	Sequence Based Typing
<b>SDS :</b>	Sodium Dodécyl Sulfate

<b>SLB :</b>	Solution de Lyse des globules Blancs
<b>SLR :</b>	Solution de Lyse des globules Rouges
<b>TPM :</b>	Tour par minute
<b>TCR :</b>	T Cell Receptor
<b>TE :</b>	Tampon d'Elution
<b>TNF :</b>	Temor Necrosis Factor
<b>TBE :</b>	Tris Borate d'EDTA
<b>TAP:</b>	Transporter associated with Antigen Processing
<b>WHO:</b>	World Health Organization

# Glossaire

- **Allèles** : On appelle allèles les différentes versions d'un même gène. Chaque allèle se différencie par une ou plusieurs différences de la séquence de nucléotides. Ces différences apparaissent par mutation au cours de l'histoire de l'espèce, ou par recombinaison génétique. Tous les allèles d'un gène occupent le même locus (emplacement) sur un même chromosome [37].
  
- **L'anthropologie** : Recherches sur la diversité et l'évolution biologique des populations humaines, avec, pour principal objectif, de reconstruire l'histoire du peuplement du monde depuis l'origine d'*Homo sapiens*. Il utilise spécialement pour cela l'analyse biostatistique et bioinformatique de données moléculaires pour différentes régions du génome telles que la région HLA, l'ADN mitochondrial et le chromosome Y, mais aussi des systèmes classiques et des SNPs et STRs nucléaires [40].
  
- **Antigène de classe I** : Antigènes-cibles dans les réactions de transplantation reconnus par des lymphocytes T cytotoxiques (Jean et Marc., 2011).
  
- **Antigène de classe II** : Antigènes intervenant dans les interactions cellulaires de la réponse immunitaire, reconnus par les lymphocytes T régulateurs (Jean et Marc., 2011).
  
- **CMH** : Ensemble de loci, extrêmement proches les uns des autres (ils présentent une liaison génétique étroite) codant pour les molécules d'histocompatibilité qui ont pour fonction de présenter les antigènes aux lymphocytes, lesquels doivent ensuite différencier les antigènes de l'organisme (soi) des antigènes étrangers (non-soi) et les éliminer [43].
  
- **Déséquilibre de liaison** : Situation dans laquelle deux allèles correspondant à deux locus distincts d'un même chromosome sont plus fréquemment associés en cis dans une population que ne le voudrait le hasard. Le déséquilibre de liaison suppose à la fois la liaison génétique et le déséquilibre gamétique. Une telle association allélique est favorisée par la proximité physique des locus et le caractère récent de la mutation ayant produit l'un des deux allèles (Rihet., 2004).

- **Exon** : Fragment de gène dont la séquence d'ADN, après transcription se retrouve dans les ARNm maturés. Cette partie du gène est le plus souvent codante [44].
- **Gène** : Unité fonctionnelle localisée sur un chromosome, et codant pour un ARN (Jean et Marc., 2011).
- **Le génome** : C'est l'ensemble du matériel génétique d'un organisme. Il contient à la fois les séquences codantes, c'est-à-dire celle qui codent pour des protéines, et les séquences non codantes. Chez la majorité des organismes, le génome correspond à l'ADN présent dans les cellules. Cependant, chez certains virus appelés rétrovirus (par exemple le VIH), le matériel génétique est de l'ARN [45].
- **Génotype** : Contenu en formes alléliques de chaque souche (Jean et Marc., 2011).
- **Greffe** : Transfert de cellules, de tissus, ou d'organes prélevés soit sur le malade lui-même (autogreffe) ou sur un donneur (allogreffe ou xéno greffe). La personne au bénéfice de la greffe s'appelle receveur. La compatibilité entre donneur et receveur est capitale. La greffe de moelle osseuse est une procédure médicale très délicate utilisée dans le traitement des leucémies [46]
- **Haplotype** : Ensemble des gènes portés par un petit fragment de chromosome, transmis en bloc. L'haplotype est la plus grande fraction du génotype pour laquelle la fréquence de crossing-over est suffisamment faible pour être considérée comme nulle (Jean et Marc., 2011).
- **Hétérozygote** : Désigne un individu diploïde pour lequel les deux allèles présents sur les deux loci des deux chromosomes correspondants sont différents (le sujet hétérozygote possède le même phénotype que l'homozygote dominant A/A, mais son génotype est différent A/a) (Jean et Marc., 2011).
- **Liaison génétique** : Lorsque deux gènes sont portés par le même chromosome, leur ségrégation (répartition dans la descendance) n'est pas indépendante. Les gènes sont dits liés. La liaison est d'autant plus forte qu'ils sont proches l'un de l'autre. Plus ils sont proches, plus ils ont de chance d'être transmis ensemble (la probabilité de crossing-over est alors très faible) (Jean et Marc., 2011).

- **Locus** : Il s'agit de l'emplacement physique d'un gène sur le chromosome (Jean et Marc., 2011).
- **Phénotype** : Expression du génotype (forme « visible » de celui-ci) (Jean et Marc., 2011).
- **Polymorphisme** : Présence dans une population d'au moins deux allèles d'un locus explorables par analyse de l'ADN ou du produit protéique (Rihet., 2004).
- **Taq polymérase** : ADN polymérase utilisé pour la duplication de l'ADN dans la réaction de PCR, cette polymérase, extraite de *thermophilus aquaticus* (microorganisme vivant près des sources hydrothermales ou la température dépasse les 100°C) a la propriété de résister à de très hautes températures, comme celles utilisé lors de la PCR et donc de rester active pendant la réaction [47].
- **Le typage HLA** : Consiste habituellement en une analyse sanguine particulière qui permet de vérifier les antigènes. Les antigènes présents sur les cellules souches du donneur doivent être identiques ou très semblables aux antigènes des cellules du receveur. La plus grande probabilité de trouver un donneur parfaitement compatible réside dans la famille du receveur, habituellement une sœur ou un frère [48].



# Introduction

Le système human leucocyte antigen (HLA), également connu sous le terme complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) est caractérisé par son polygénisme et son polymorphisme. Le typage HLA de cette diversité structurale est largement utilisé en médecine pour la sélection de donneurs et de receveurs de transplantation d'organes ou de greffe de cellules souches hématopoïétiques et dans l'évaluation de risque vis-à-vis de certain maladies tel que la spondylarthrite ankylosante, la maladie de Bechet... D'un point de vue anthropologique, le polymorphisme du système HLA et l'existence de déséquilibre de liaison ont permis d'améliorer nos connaissances sur les populations, en particulier sur les mécanismes d'isolation génétique et de métissage inter populationnel.

Ce travail réalisé au niveau de l'hôpital Isaad Hassani de Béni Messous, au laboratoire d'immunologie médicale -Unité d'histocompatibilité et unité d'immunogénétique- a pour but de proposer une base de référence pour la greffe de moelle osseuse et la recherche de donneurs compatibles dans les pays maghrébins, et l'utilisation de cette base de référence pour les études à venir portant sur les associations HLA et maladies. De plus, ce travail vise à étudier la fréquence allélique des antigènes HLA dans la population Algérienne par le biais de la technique de biologie moléculaire « PCR-SSP », et poursuivre cette étude par une comparaison avec d'autres populations, avec l'idée de se servir du système HLA comme marqueur d'une expression génétique identitaire.

# Synthèse bibliographique

# Synthèse bibliographique

---

## Chapitre 1 : Le système HLA

### 1-Historique :

Entre 1936 et 1938, une étude systématique du rejet des tumeurs chez la souris effectuée par Gorer a montré que ces rejets étaient liés à des différences entre donneur et receveur situées sur des protéines exprimées à la surface des cellules. Après cette observation, Gorer a défini le complexe majeur d'histocompatibilité qui fut dénommé H2. Afin d'étudier les problèmes de rejet de greffe, Medawar observe que les autogreffes de peau chez les grands brûlés ne sont pas rejetées, contrairement aux allogreffes, il émet l'hypothèse que ce rejet était un mécanisme immunologique, ce qu'il confirme par des expériences sur des animaux de laboratoire en 1943. Après cinq ans, Snell a montré que le rejet est déterminé par un système génétique qu'il appelle système d'histocompatibilité II ou H2, et ceci en utilisant des souris congéniques (différentes au niveau du gène étudié, identiques au niveau de tous les autres gènes). L'appellation Ag HLA a été mise en évidence en 1958 par Dausset après avoir observé l'existence des Ag semblables aux Ag H2 à la surface des leucocytes humains. (Jean et Marc., 2011 ; Pommier ., 2012 ; Masmoudi ., 2009).

### 2- Définition :

Le système immunogénétique humain leukocyte antigen (HLA) fait partie d'un ensemble génétique complexe, noté complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) localisé chez l'homme sur le bras court du chromosome 6, sur une distance totale de 3,6 mégabases (Cesbron et al ., 2015). Il s'agit d'un système polygénique dont les gènes HLA sont extrêmement polymorphes. Sa principale fonction est la présentation des peptides aux cellules impliquées dans la réponse immune, cette présentation régulant l'induction de cette réponse (Moalic et Ferec ., 2005). Historiquement, la découverte de ce système a permis de comprendre les mécanismes de rejet d'une greffe d'organe survenant de façon quasi inévitable entre deux individus non apparentés (Eliaou ., 2007).

## 3- Structure général du système HLA :

Le CMH a une organisation relativement conservée chez les différentes espèces des vertébrés. Il correspond à un système multigénique, multiallélique, d'expression codominante dont les gènes sont regroupés sur un segment chromosomique de 4000 kb (kilobases) appelé région HLA (Jean et Marc., 2011).

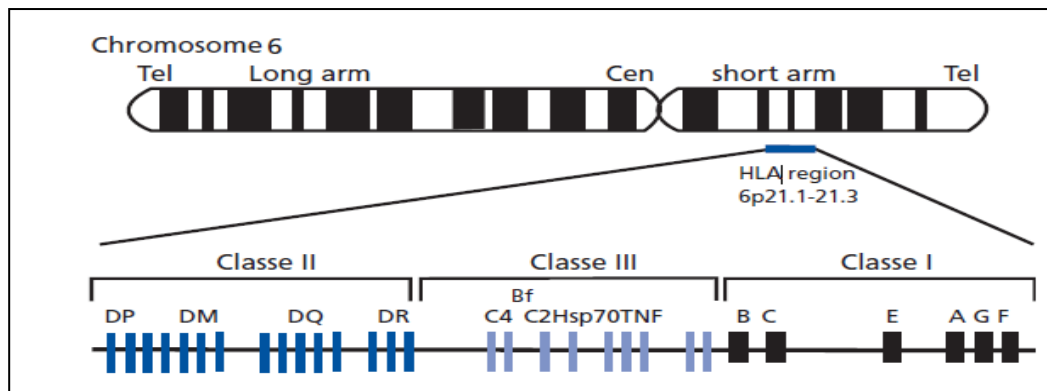


Figure N°01 : Cartographie de la région HLA sur le chromosome 6 humain (Moalic, et Ferec ., 2005)

### 3-1- HLA classe I :

La région de classe I, la plus télomérique s'étend sur 2000 kb, contient les gènes de classe I classiques HLA-A, B, C, ainsi que des gènes HLA de classe I dits non-classiques (HLA-E, F et G, MICA et MICB et HFE), et de nombreux autres gènes dont la fonction n'est actuellement pas connue (Forbes et Trowsdale J. 1999).

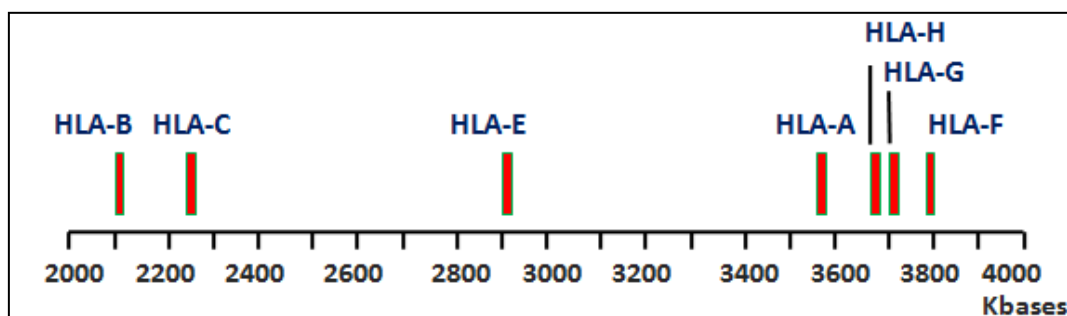


Figure N°02 : Structure génomique du CMH I humain

## Synthèse bibliographique

### 3-2-HLA classe II :

La région de classe II, la plus centromérique s'étend sur 1000 kb, contient environ 32 gènes dont les principaux sont les gènes HLA DR, DQ et DP, Codant pour les molécules HLA II, HLA DR, HLA DQ et HLA DP ainsi qu'une série de gènes codant pour des produits intervenant dans les voies de présentation antigénique (gènes LMP, TAP, DM, DO). (Forbes et Trowsdale J. 1999).

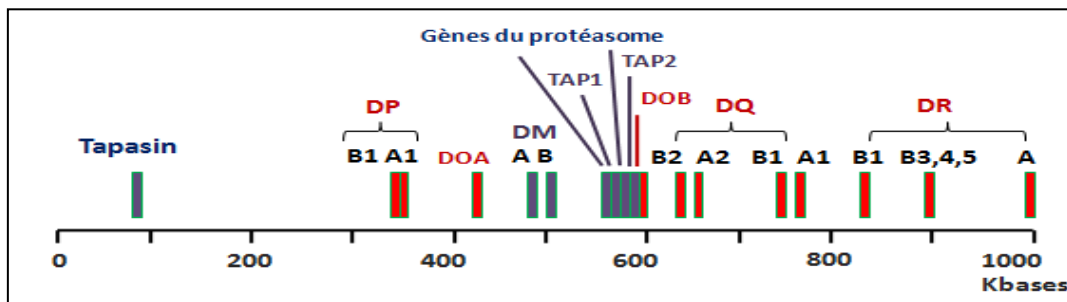


Figure N°03 : Structure génomique du CMH II humain

### 3-3-HLA classe III :

La région de classe III, prend une position intermédiaire et s'étend sur 1000 kb, ne contient pas de gènes d'histocompatibilité à proprement dit, mais des gènes codant pour des produits intervenants dans la réponse immunitaire tel que certains facteurs du complément (C2, C4A, C4B et Bf), facteurs nécrosant des tumeurs (TNF alpha et beta), protéines de choc thermique (HSP 70.2, 70.1 et AOM), ainsi que des gènes qui n'ont a priori rien à voir avec la réponse immune, tels que le gène CYP21-B codant pour la 21 hydroxylase (Forbes et Trowsdale J. 1999).

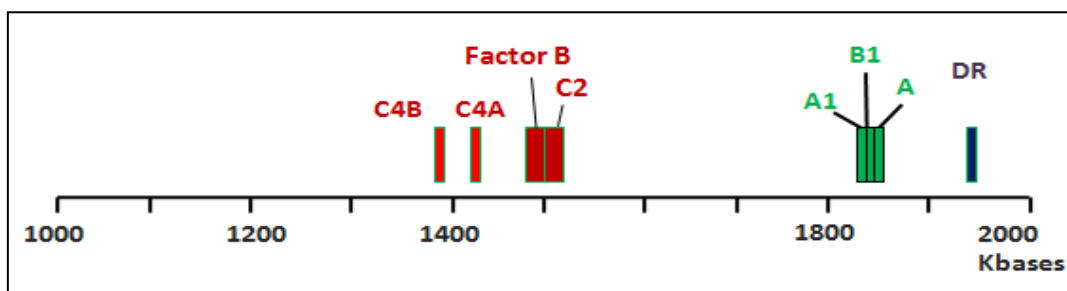


Figure N°04 : Structure génomique du CMH III humain

### 4- Organisation génétique et structure moléculaire :

On ne détaillera pas la classe III, il faut cependant savoir qu'on continue à l'appeler HLA alors qu'aucune molécule HLA n'est codée par des gènes présents sur cette région. Néanmoins, on s'aperçoit que parmi les gènes présents sur cette région HLA de classe III, il y a de nombreux gènes très importants dans les réponses immunitaires (Teisserenc ., 2012).

#### 4-1- Gènes et molécules de classe I :

##### 4-1-1- Les gènes :

Il existe plusieurs centaines de gènes HLA de classe I. Les trois principaux sont :

Les gènes HLA-A, -B et -C. Ces gènes sont polymorphes (polyalléliques) et codent pour les chaînes  $\alpha$  des molécules HLA de classe I membranaires.

La structure du gène est organisée en **8 exons** séparés par **7 introns**.

L'**exon 1** code pour le peptide signal clivé lors de transport intracellulaire de la molécule.

Les **exons 2, 3 et 4** codent respectivement pour les domaines  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$  de la chaîne  $\alpha$ .

Les **exons 5, 6, 7 et 8** codent pour le peptide de connexion et la région transmembranaire.

La majorité du polymorphisme est concentrée au niveau des exons **2** et **3**, qui codent pour les domaines  **$\alpha 1$**  et  **$\alpha 2$**  de la chaîne  $\alpha$ .

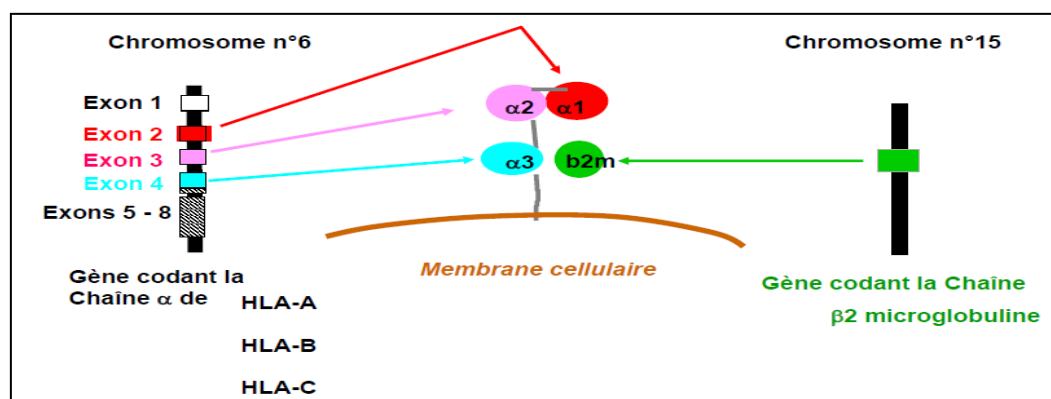


Figure N°05 : Gènes et molécules HLA classe 1 (M.Abbal ., 2009)

##### 4-1-2- Les molécules :

Les molécules HLA I sont des hétérodimères formées de l'association non covalente de deux chaînes polypeptidiques, une chaîne lourde  $\alpha$  et une chaîne  $\beta$ -2-microglobuline codée par un gène se trouvant hors du locus CMH (chromosome 5).

## Synthèse bibliographique

---

Les deux sont repliées en domaines, avec 3 domaines extracellulaires caractéristiques des immunoglobulines ( $\alpha 1$  le plus externe, puis  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$ ) suivis d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracytoplasmique et des ponts disulfures assurent l'organisation globulaire de la molécule. Les domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  amino-terminaux forment un sillon de liaison correspondant à des peptides de 8 à 11 acides aminés (poche de fixation des peptides). La variabilité allélique pour les molécules HLA de classe I va donc se retrouver au niveau des séquences qui codent pour les chaînes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  (la chaîne  $\alpha 3$  est peu variable). La cavité n'est jamais vide : elle est toujours occupée par un peptide (sinon la molécule est instable et ne peut arriver à la membrane). Les peptides présentés sont endogènes (peptides du soi ou d'origine virale). (Tissier et Asesio ., 2015).

### 4-2- Gènes et molécules de classe 2 :

#### 4-2-1- Les gènes :

La région HLA classe II comprend un grand nombre de gènes regroupés en 3 sous régions principales : HLA DR, HLA DQ et HLA DP. Chacune d'entre elles contient : Des gènes A (DRA, DQA, DPA) qui codent pour la chaîne  $\alpha$  et des gènes B (DRB, DQB, DPB) qui codent pour la chaîne  $\beta$ .

Chaque gène est constitué d'un ensemble d'exons séparés par des introns dont, la majorité du polymorphisme est concentrée au niveau des exons 2, qui codent pour les domaines  $\alpha 1$  et  $\beta 1$ .

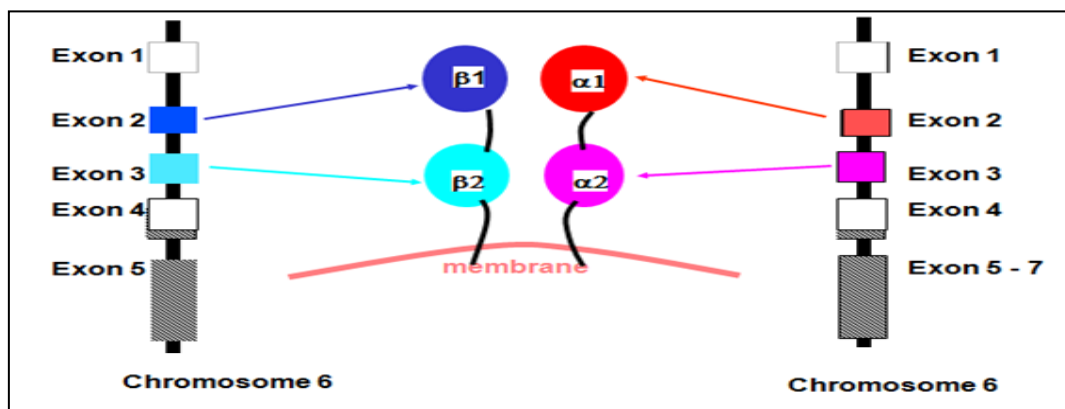


Figure N°06 : Gènes et molécules HLA classe II (M.Abbal ., 2009)



## Synthèse bibliographique

---

Pour le gène DR on distingue : DRB1, DRB2 et DRB3 qui codent pour la chaîne  $\beta$  mais DRB1 est le plus important car il est toujours présent chez tous les individus. En fonction des gens (ce n'est pas du polymorphisme), on peut avoir un 2<sup>ème</sup> gène : DRB2 ou DRB3, qui va coder pour une 2<sup>ème</sup> chaîne  $\beta$  et donne la possibilité aux individus qui portent ce gène supplémentaire d'avoir une molécule supplémentaire HLA-DR (Teisserenc ., 2012)

### 4-2-2- Les molécules :

Les molécules HLAII sont des glycoprotéines transmembranaires constituées de deux chaînes,  $\alpha$  et  $\beta$  codées par le même locus. Ces deux chaînes s'associent à la membrane par la présence de ponts disulfure, avec une organisation en domaines globulaires. Les domaines amino-terminaux  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  contiennent des résidus polymorphes formant une poche suffisamment large pour recevoir des peptides de 10 à 30 résidus. Le domaine  $\beta 2$  contient le site de liaison du co-récepteur CD4 des lymphocytes T auxiliaires. Elles présentent majoritairement des antigènes extracellulaires (bactéries, parasites...) (Tissier et Asesio., 2011).

## 5- Caractères principaux du système HLA :

### 5-1- Le polymorphisme :

Il existe dans l'espèce humaine un très grand nombre d'allèles pour chaque gène HLA (plusieurs centaines pour la plupart d'entre eux : ce sont les gènes les plus polymorphes de l'espèce humaine). Chaque individu est hétérozygote pour la plupart de ses gènes HLA, et n'exprime qu'un ou deux des allèles de chaque gène présents dans l'espèce humaine. Cette caractéristique rend chaque individu quasiment unique (**Labalette et al**). En effet, c'est par la comparaison des individus d'une population que peut être défini le polymorphisme du système HLA. Les bases moléculaires du polymorphisme du système HLA sont la présence de nombreux gènes multi-alléliques et une transmission co-dominante des gènes (Eliaou., 2007).

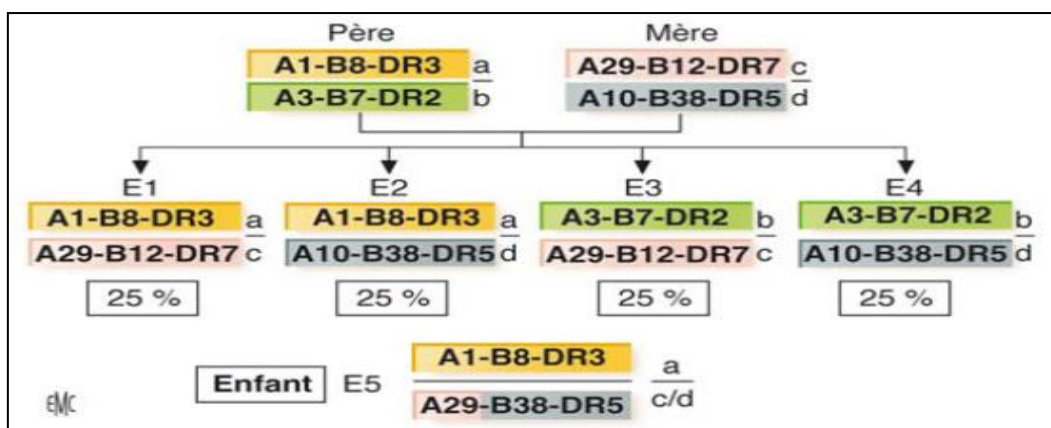
### 5-2- La codominance :

Les 2 allèles parentaux de chaque gène HLA sont exprimés (chaque allèle exprimé est en général exprimé de la même façon : pas de gène dominant ou récessif). Dans 98 % des cas, l'ensemble des gènes HLA de classe I et II est transmis "en bloc" à la descendance sans

## Synthèse bibliographique

recombinaison chromosomique à la méiose. Chaque parent possède, sur chaque chromosome 6, une combinaison fixe d'allèles définissant un haplotype. Au total, pour les deux parents, quatre haplotypes sont définis : deux chez le père (a et b) et deux chez la mère (c et d). Chaque enfant recevra un haplotype venant du père et un haplotype venant de la mère dont les produits protéiques seront exprimés à la surface des cellules. Il existe donc quatre types d'individus dans la fratrie (germains) : a-c, a-d, b-c, bd. Ainsi, la probabilité pour que deux germains soit HLA-identiques est 25 %, HLA semi-identiques 50% et HLA différents 25 % (Eliaou., 2007).

Cependant, dans de rares cas (moins de 1% des cas), une recombinaison entre 2 haplotypes paternels et/ou maternels « *Crossing over* » peut survenir, créant un nouvel haplotype dit recombinant (E5) [Figure7] (Cesbron et al ., 2015).



**Figure N°07 :** Transmission familiale des haplotypes « human leukocyte antigène »  
(Cesbron et al ., 2015)

### 5-3- Le déséquilibre de liaison :

Le nombre des haplotypes présents dans la population humaine est très grand, avec deux chromosomes non identiques, le nombre total de génotypes possibles est énorme. En ne tenant compte des allèles actuellement connus, les combinaisons possibles permettent un grand nombre d'haplotypes. Tout individu risque donc de différer d'un autre individu par au moins un gène HLA «La solitude génétique» (Decoster. **Le soi et le non soi**).

## Synthèse bibliographique

En théorie tout allèle d'un locus HLA peut être associé à n'importe quel allèle d'un autre locus, mais certains allèles d'un locus sont associés préférentiellement et bien plus souvent que ne le voudrait le simple hasard avec des allèles d'un autre locus, c'est le déséquilibre de liaison.

Il existe plusieurs sortes de déséquilibre de liaisons, entre les allèles de classe I (A1 B8), entre des allèles de classe II (DR3 et DQ2), ou entre les allèles de classe I et classe II (B8-DR3) (SEYDOU GAOH., 2006). Ces déséquilibres varient dans les différentes ethnies, de même que la fréquence des différents allèles dans celles-ci. (Al yousse,A ., 2006).

<b>Exemple : combinaison allélique (haplotype)</b>	
<b>HLA-B8/HLA-DR3</b>	
$F_{pop}^{B8} = 0.10$	$F_{th}^{B8-DR3} = (0,10 \times 0,12) 0.012$
$F_{pop}^{DR3} = 0.12$	$F_{ob}^{B8-DR3} = 0.074$
<b>Déséquilibre de liaison (<math>\Delta</math>) = 0.062</b>	
Exemples de combinaison d'allèles en déséquilibre de liaison	
A1, B8	53.2
B7, DR2	36.8
B8, DR3	61.3
DR2, DQ1	93.6
DR4, DQ3	87.5

**Figure N°08** : Exemple de déséquilibre de liaison (Eliaou ., 2007)

### 6- Inconvénients du polymorphisme :

- Conséquences vaccinales : Un même Ag vaccinal sera présenté plus ou moins bien selon les individus : Ex. hépatite B : HLA-DQ2, DQ3, DR7 : faibles répondeurs.
- Conséquences en biologie médicale : « faux négatifs » pour les tests d'activation lymphocytaire en présence d'Ag spécifiques. Exemple : certaines ethnies ne répondent pas aux Ag utilisés pour le test QuantiFERONND
- Conséquences pathologiques : HLA et maladies (Annexe V) et Conséquences pour la greffe (Elsermans ., 2013)

## Chapitre 2 : Nomenclature et dénombrement des allèles HLA

### 1- La nomenclature HLA :

Devant l'accumulation des données, et en raison de la diversité (polymorphisme) de ce système, un comité international de nomenclature « WHO Nomenclature Committee For Factors of the HLA System » définit régulièrement les règles d'écriture. Celles-ci permettent de référencer clairement les régions géniques (loci), les allèles (ou gènes), les produits (ou antigènes) HLA propres à ce CMH. (Cesbron et al ., **2015**).

La nomenclature des gènes et des molécules HLA est mise à jour régulièrement. Concernant la nomenclature sérologique, les antigènes HLA sont désignés par le nom du locus suivi d'un chiffre (par exemple HLA-A2, HLA-DR3) (Moalic et Ferec ., **2005**). Pour la nomenclature de biologie moléculaire, le nom du gène étudié est suivi d'un astérisque puis du numéro de l'allèle (par exemple HLA-A\*11, HLA-DRB1\*15). Le numéro de l'allèle contient toujours 2 chiffres (par exemple HLA-A2 en sérologie correspond à HLA-A\*02 en biologie moléculaire). Lorsque le typage effectué permet de définir une spécificité HLA à 2 digits, on parle de typage générique (par exemple HLA-B\*44). Lorsqu'il permet de définir une spécificité HLA à 4 digits, on parle de typage spécifique ou allélique (par exemple, il existe plusieurs sous-types de l'allèle HLA-C\*44 parmi lesquels HLA-C\*0701, HLA-C\*0702, HLA-C\*0704, et plusieurs sous-types de l'allèle HLA-A\*02 parmi lesquels HLA-A\*0301, HLA-A\*0302, etc (Moalic et Ferec ., **2005** ; Rendine ., **2012**).

### 2- Nomenclature des allèles HLA :

Chaque nom de l'allèle HLA a un numéro unique correspondant à un maximum de quatre séries de chiffres séparés par des virgules. La longueur de la désignation de l'allèle est dépendante de la séquence de l'allèle et celle de son parent le plus proche. Tous les allèles reçoivent au moins un nom à quatre chiffres, ce qui correspond aux deux premières séries de chiffres, des noms plus longs ne sont assignés lorsque nécessaire. (SGE Marsh ., **2015**)

## Synthèse bibliographique

**Tableau N°01 : Nomenclature des allèles HLA (SGE Marsh 2015)**

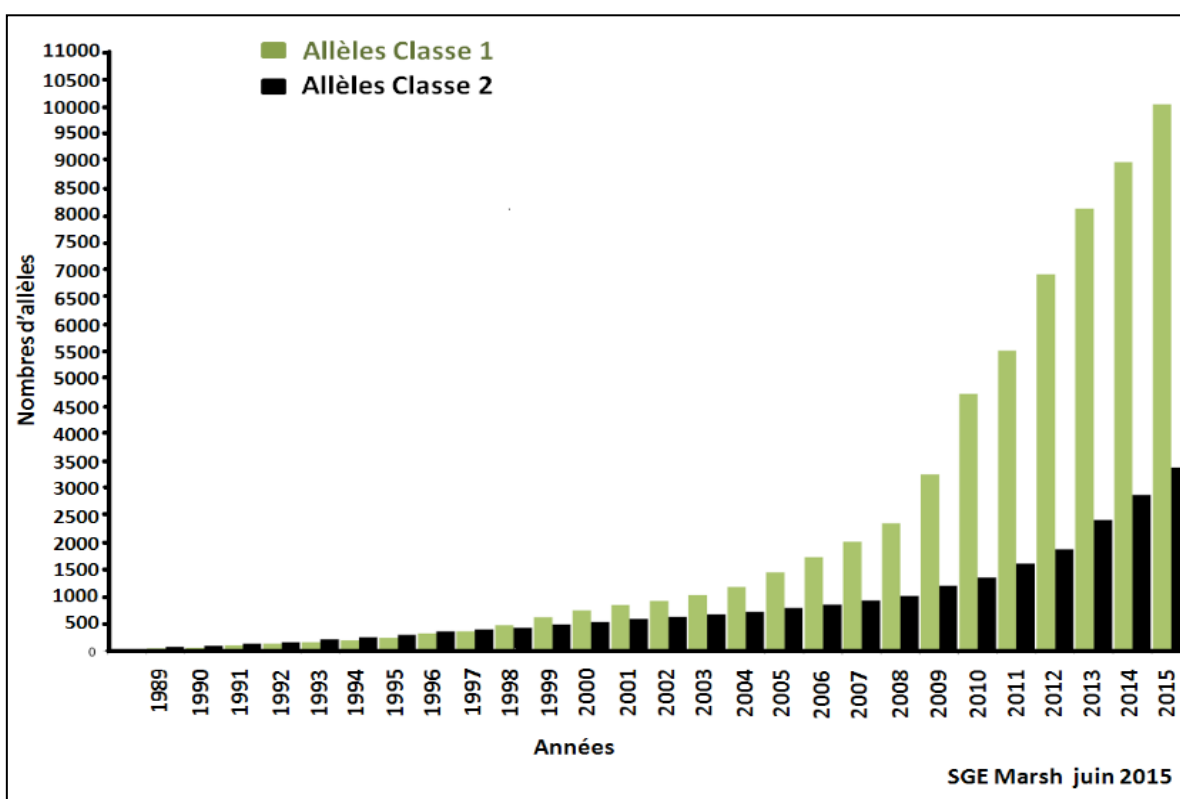
Nomenclature	Indications
HLA	La région HLA
HLA-DRB1	Un locus HLA DRB1
HLA-DRB1 * 13	Un groupe d'allèles qui codent pour l'antigène ou DR13 (homologie de séquence avec d'autres allèles DRB1 * 13)
HLA-DRB1 * 13: 01	Un allèle HLA spécifique (allèle particulier, différence en acide aminé)
HLA-DRB1 * 13: 01: 02	Un allèle qui diffère par une mutation silencieuse (synonyme de <i>DRB1 * 13: 01: 01</i> ) Substitutions de nucléotide au niveau du 3e nucléotide d'un codon généralement
<i>HLA-DRB1 * 13: 01: 01: 02</i>	Un allèle qui contient une mutation en dehors de la région codante de <i>DRB1 * 13: 01: 01: 01</i>
HLA-A * 24: 09N	Allèle «Null», un allèle qui ne est pas exprimé.
HLA-A * 30: 14L	Un allèle codant pour une protéine avec l'expression de surface cellulaire «Faible» considérablement réduite.
HLA-A * 24: 02: 01: 02L	Un allèle codant pour une protéine ayant sensiblement réduit l'expression de la surface cellulaire "Low", où la mutation se trouve en dehors de la région codante
HLA-A * 32: 11Q	Un allèle qui a une mutation qui a été précédemment montré un effet significatif sur l'expression de surface cellulaire, mais où cela n'a pas été confirmé et son expression reste douteuse.

## Synthèse bibliographique

### 3- Dénombrement des allèles HLA :

Le nombre des allèles HLA continue à augmenter clairement grâce à l'évolution des techniques de la biologie moléculaire et notamment les techniques de PCR qui ont permis l'identification du polymorphisme des gènes HLA et ont conduit à la mise en évidence d'une extrême diversité allélique (Cesbron et al., 2015).

Le graphique suivant montre le nombre d'allèles nommés par année de 1987 à la fin de juin 2015 décrit par le Professeur Steven GE Marsh, Président, Comité de la nomenclature de l'OMS pour les facteurs du système HLA (SGE Marsh., 2015).



**Figure N°09 :** Graphique montrant le nombre d'allèles nommés par année de 1987 à la fin juin 2015 (SGE Marsh 2015)

## Synthèse bibliographique

---

Les tableaux suivants montrent le nombre actuel des allèles HLA classe I, HLA classe I pseudogènes, HLA classe II et HLA classe II DR.

**Tableau N°02 : Nombre des allèles HLA (SGE Marsh 2015)**

<b>Nombre des allèles HLA</b>	<b>13239</b>
<b>Les allèles HLA de classe I</b>	9749
<b>HLA de classe II allèles</b>	3274
<b>Allèles HLA</b>	13023
<b>Autres non-allèles HLA</b>	166
<b>Nombre de confidentiels allèles</b>	50

**Tableau N°03 : Nombre des allèles HLA classe I (SGE Marsh 2015)**

<b>Gene</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>E</b>	<b>Fa</b>	<b>Sol</b>
<b>Allèles</b>	3107	3887	2623	17	22	50
<b>Protéines</b>	2185	2870	1850	6	4	16
<b>Nulle</b>	147	124	81	1	0	2

**Tableau N°04 : Nombre des allèles HLA classe I - pseudogène (SGE Marsh 2015)**

<b>Gène</b>	<b>H</b>	<b>J</b>	<b>K</b>	<b>L</b>	<b>P</b>	<b>T</b>	<b>U</b>	<b>V</b>	<b>W</b>	<b>X</b>	<b>Y</b>
<b>Allèle</b>	12	9	6	5	5	0	0	3	0	0	3
<b>Protéine</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Nulle</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

## Synthèse bibliographique

---

**Tableau N°05 : Nombre des allèles HLA classe II (SGE Marsh 2015)**

Gène	DRA	DRB	DQA1	DQB1	DPA1	DPB1	DMA	DMB	DOB
Allèle	7	1829	54	780	39	520	7	13	13
Protéine	2	1335	32	515	20	424	4	7	5
Nulle	0	45	1	19	0	13	0	0	0

**Tableau N°06 : Nombre des allèles HLA classe II – DRB (SGE Marsh 2015)**

Gene	DRB1	DRB2	DRB3	DRB4	DRB5	DRB6	DRB7	DRB8	DRB9
Allèle	1726	1	59	15	21	3	2	1	1
Protéine	1262	0	47	8	18	0	0	0	0
Nulle	39	0	1	3	2	13	0	0	1



## **Chapitre 3 : HLA et populations**

Au cours des dernières décennies, plusieurs centaines de populations humaines ont été testées par des méthodes immunologiques pour des systèmes hautement polymorphiques, et ces données nous permettent aujourd'hui de décrire les différenciations génétiques des populations humaines, de manière très détaillée, à l'échelle planétaire (Mazaz et Pellegrini ., **1990**).

### **1- Utilité du système HLA dans la génétique des populations :**

En raison de son très grand polymorphisme et de la transmission en bloc (haplotypique) de l'ensemble de ces marqueurs présents sur le chromosome 6, le système HLA est considéré comme marqueur d'une expression génétique identitaire, il s'est révélé extrêmement précieux pour les généticiens de population. Les techniques d'étude du polymorphisme au niveau génomique permettent l'identification régulière de nouveaux allèles dans chaque série (A, B, C, DR, DQ et DP) lors des études anthropologique élargies (études workshops). Les rares recombinaisons chromosomiques entre marqueurs de la région HLA, le déséquilibre de liaison caractéristique de certain haplotype, les variations de fréquence d'allèles selon les origines ethniques, les résistances ou susceptibilités aux maladies représentent des éléments d'étude et de compréhension de la dynamique des populations (Cesbron et all ., **2015**).

### **2- Etude du polymorphisme HLA chez les populations maghrébines**

Le tiers des études menées sur le système HLA au Maghreb portent sur la connaissance du polymorphisme de ce système en général, c'est-à-dire à un niveau national sans référence à des populations précises, un autre tiers concerne les relations entre HLA et maladies et le dernier tiers des travaux est réalisés dans une perspective anthropologique avec l'idée de se servir du système HLA comme marqueur d'une expression génétique identitaire (Algérie , Tunisie, Maroc) (Moalic et Ferec, 2005).

## **Chapitre 4 : Méthodes d'études du système HLA :**

Les opérations « histocompatibilité » comportent plusieurs analyses différentes : les typages HLA (par lymphocytotoxicité ou par biologie moléculaire), la détection et l'identification des anticorps anti-HLA et l'épreuve de compatibilité entre des lymphocytes et des sérums (cross-match). (LEE-ROBIN., 2009)

### **1- Technique sérologique par micro-lymphocytotoxicité**

Le typage HLA en sérologie a été à la base de la caractérisation du complexe majeur d'histocompatibilités chez l'Homme, ou système HLA. Cette technique permet d'identifier chez un sujet quelles protéines HLA membranaires (antigènes HLA) sont codées par les allèles des différents locus HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DQ. Elle est toujours pratiquée dans les laboratoires d'histocompatibilités mais ses indications se sont restreintes depuis l'avènement des techniques de biologie moléculaire (PCR-RFLP, PCR-SSO, PCR-SBT, PCR-SSP et séquençage) qui permettent d'atteindre des typages HLA plus résolus, jusqu'au niveau allélique (Guide des analyses en immunologie.2014).

### **2- Technique de biologie moléculaire PCR-SSP (Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Primers)**

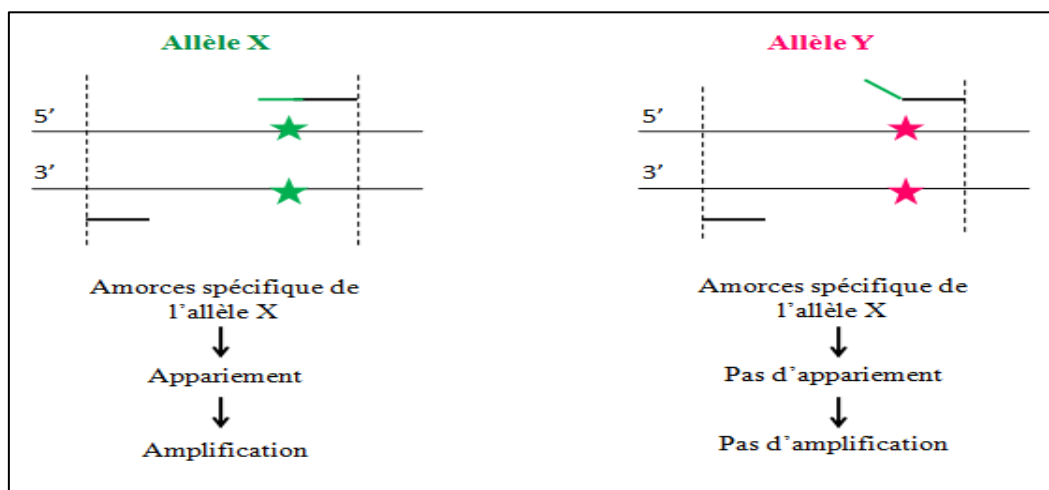
#### **2-1- Définition :**

Des applications ont été développées permettant la réalisation des typages HLA. Parmi celles-ci, la technique de Polymérase Chain Réaction -Sequence Specific Primers (PCR-SSP) , cette technique est basée sur l'utilisation d'amorces spécifiques d'un allèle (sequence specific primers) ou d'un groupe d'allèles en fonction du degré de résolution de l'amorce (LEE-ROBIN., 2009). L'amplification ne sera vraiment effective que si la séquence de l'amorce est complémentaire de la séquence présente dans l'ADN génomique (Moalic, V ., 2008).

Le typage HLA par PCR-SSP repose principalement sur l'étude ciblée des exons 2 et 3 pour la classe I et de l'exon 2 pour la classe II, qui codent la poche de fixation des peptides, site d'interaction avec le récepteur des lymphocytes T , permettant d'identifier chez un sujet quels sont les allèles des gènes HLA qu'il possède au niveau des différents locus de classe I et II.

## Synthèse bibliographique

Seules ces approches permettent un typage HLA de haute résolution indispensable dans les allogreffes de cellules souches avec donneurs non apparentés ou pour l'étude de certains locus HLA (Guide des analyses en immunologie. **2014**).



**Figure N°10** : Principe de la PCR-SSP

### 2-2- La découverte de la PCR-SSP :

En 1991, Olle. Olerup a décrit la technique de PCR-SSP dans le cadre du HLA.

Olerup SSP a été fondée en 1992 par le professeur Olle. Olerup, qui à l'époque travaillait à l'hôpital de Huddinge à Stockholm. Au cours des années 1992-2008, il a bâti une entreprise bien positionnée sur les marchés internationaux, avec une marque bien connue pour le typage HLA. (Transplantation / Olerup SSP., **2015**)

### 2-3- Avantages et inconvénients :

#### 3-3-1-Avantages :

- PCR-SSP fonctionne pour tous les loci HLA, fournissant des résultats précis et rapides avec un haut niveau de résolution. (Transplantation / Olerup SSP., **2015**)
- Olerup SSP offre actuellement autour de 115-120 différents kits de typage, couvrant les allèles HLA qui ont été identifiés à ce jour (Transplantation / Olerup SSP., **2015**).
- Le génotypage par PCR-SSP est une méthode rapide adaptée aux situations d'urgence où une résolution moyenne est requise dans un délai très court (Guide des analyses en immunologie., **2014**).

## Synthèse bibliographique

---

### 3-3-1 Inconvénients :

De nombreux facteurs peuvent affecter l'efficacité de la PCR et sont à l'origine de différents problèmes pouvant être rencontrés lors d'une réaction PCR, dont, les principaux sont trouvés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau N°07 :** Guide de résolution des problèmes du typage HLA (Mode d'emploi des kits de typage HLA.2014)

Problèmes	Causes	Solutions
<b>Pas d'amplification (aucun contrôle interne, ni de produits spécifiques).</b>	Quantité d'ADN insuffisante.	Refaire l'extraction d'ADN avec précautions en utilisant des solutions récemment préparées.
	L'ADN contient des inhibiteurs de PCR. Par exemple des protéines ou de l'éthanol (provenant des phases de précipitation),	Evaluer la qualité de l'ADN. Il est recommandé d'utiliser un ratio A260/A280 de 1,6 – 2,0 mesuré par spectrophotométrie.
	L'ADN a été extrait sur du sang hépariné.	Utiliser du sang non hépariné
	Le thermocycleur ne fonctionne pas correctement.	
Signaux d'amplification de plus en plus faibles au cours du temps.	La solution de bromure d'éthidium est trop ancienne.	Préparer une nouvelle solution de bromure d'éthidium pour obtenir une meilleure coloration du gel d'agarose et donc un meilleur signal.

# Matériels et Méthodes

### 1- Matériels

#### 1-1- Échantillonnage

Notre travail expérimental a été réalisé au niveau de l'hôpital Isaad Hassani de Béni Messous, au laboratoire d'immunologie médicale -Unité d'histocompatibilité et unité d'immunogénétique - pendant une durée de 3 mois, de Mars jusqu'à la fin Mai.

Afin de pouvoir étudier la fréquence des antigènes HLA classe I et II chez la population Algérienne, nous avons réalisé une étude sur un ensemble de sujets algériens incluant 271 donneurs volontaires issus de familles résidant dans différents wilayas d'Algérie, 132 hommes et 139 femmes dont l'âge varie entre 3 et 67 ans.

L'unité d'histocompatibilité et l'unité d'immunogénétique effectuent en permanent des bilans de pré-greffe, faisant augmenter notre cohorte de sujets sains, pour lesquels le typage HLA-A, B, C, DR et DQ a été fait par la technique de biologie moléculaire (PCR-SSP), Ceci a permis de confirmer la distribution des fréquences alléliques des antigènes HLA a fin de pouvoir établir une comparaison avec autres populations et utiliser le système HLA dans un perspective anthropologique .

Comme il a été déjà mentionné, notre cohorte a inclus 271 sujets Algériens pour lesquelles l'étude faite est de type prospectif sur 40 sujets Algériens sains, et de type rétrospective sur 231 sujets Algériens sains dont les résultats sont répertoriés sur les registres du service.

- Pour chacun des sujets 2 prélèvements ont été effectués, 2 tubes avec anticoagulant EDTA pour l'extraction de l'ADN.
- Le typage HLA a été réalisé par la technique de biologie moléculaire PCR-SSP  
« *sequence-specific primer amplification* »

### **1-2- Appareillage**

Le matériel nécessaire pour la réalisation de notre étude se compose de :

- Principalement, Un appareil de PCR Perkin Elmer Gene AMP 9700 pour l'amplification des allèles HLA classe I et II.
- UV transilluminator Gel Doc Bio-Rad pour la visualisation sous lumière UV des bandes et interprétation des résultats.
- Un ensemble de verreries de laboratoire et de réactifs.

### **2- Méthodes**

Les méthodes suivantes correspondant à 40 échantillons pour lesquels L'ADN génomique a été extrait à partir du sang total en utilisant le protocole d'extraction « salting out » et le typage HLA a été fait par la technique de biologie moléculaire « PCR-SSP ».

#### **2-1- Extraction de l'ADN par salting out**

##### **2-1-1- Principe**

L'ADN utilisé comme matrice d'amplification pour les réactions PCR a été extrait par la technique du relargage des protéines à force ionique élevée : la technique de salting-Out (Technique au chlorure de calcium saturé) (*Miller. S. A et al., 1988*). Le sang doit être initialement et vigoureusement mélangé à une solution hypotonique pour faire éclater les globules rouges. Le lysat est centrifugé et, après élimination du surnageant, le culot cellulaire contenant les leucocytes est traité par une solution de lyse de GB (SLB) et une solution de protéinase très active, la protéinase K qui digère les protéines cellulaires. Ces dernières seront par la suite relarguées par l'intermédiaire d'une force ionique du NaCl. En fin, la précipitation de l'ADN génomique est effectuée en utilisant une solution d'éthanol. (*Delpech. M et al., 1999; Raisonnier. A et al., 2002*).

##### **2-1-2- Le mode opératoire**

L'ADN est extrait à partir du sang total, 10 ml de sang sont prélevés dans des tubes contenant un anticoagulant (EDTA), l'ADN est ensuite récupéré à partir de leucocytes par un protocole d'extraction.

### **a) Lyse des globules rouges**

Les globules rouges anucléés sont lysés dans une solution de lyse SLR 1x (solution hypotonique permettant l'éclatement de la membrane cellulaire) dont la constitution est la suivante:  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{KHCO}_3$ , EDTA.

- **1<sup>er</sup> lavage**

Ajouter au volume du sang prélevé sur EDTA la solution de lyse de globule rouge (SLR) PH7, puis agiter vigoureusement et incubé dans la glace pendant 30 min. Centrifuger pendant 10 min à 2500 tours.min<sup>-1</sup> et à 4°C puis jeter le surnageant et garder le culot.

- **2<sup>ème</sup> lavage**

Ajouter le même volume de solution de lyse des globules rouges (SLR) puis agiter vigoureusement et centrifuger pendant 10 min à 2500 tours. min<sup>-1</sup> et à 4 °C. Eliminer le surnageant et garder le culot. Répéter cette étape (sans incubé dans la glace) jusqu'à l'obtention d'un culot. (Le culot est constitué de leucocytes).

### **b) Lyse des globules blancs**

Le culot leucocytaire est ensuite récupéré, on ajoute 20 ml de tampon de lyse (SLB) 1x dont la composition est la suivante : Tris-HCL, NaCl, EDTA, H<sub>2</sub>O. Bien agiter a fin de solubiliser les membranes plasmiques puis ajouter la Protéinase K qui est une serine protéase non spécifique permet, après un temps d'incubation, de détruire les protéines liées à l'ADN et le SDS, un détergent, qui va lyser la membrane cellulaire des leucocytes en agissant sur les lipides membranaires. Le lysat est incubé une nuit au bain marie à 37°C.

### **c) Extraction par NaCl**

Ajouter le NaCl et bien vortexer pour avoir une mousse blanchâtre puis centrifuger 15 min, 3600 RPM à 4°C.

### **d) Précipitation à l'éthanol**

Elle se fait en ajoutant deux volumes d'éthanol glacé à 100 %, suivi d'une agitation douce qui fera apparaître la méduse d'ADN récupérée dans un tube « Ependorff », par la suite en effectue un lavage de la méduse avec de l'Ethanol 70%, laisser sécher pendant 24h puis resuspendre la méduse dans l'eau distillé.



### Conservation de l'ADN

La conservation se fait à 4°C et pendant une période illimitée.

Le détail du mode opératoire (Annexes I).

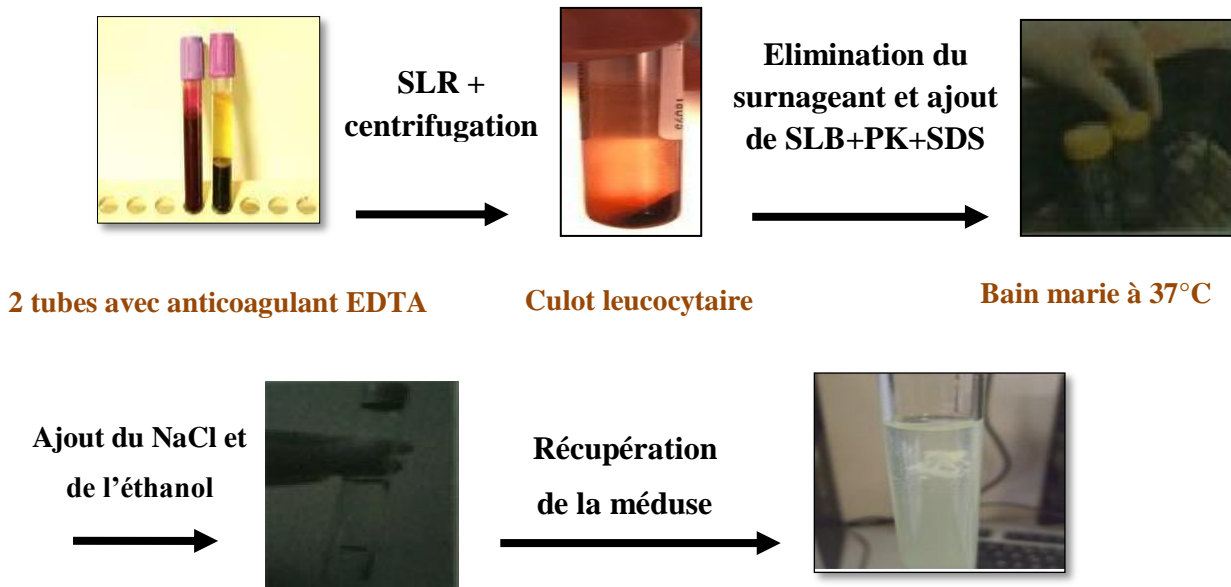


Figure N°11 : Les principales étapes de la technique de « salting out »

### 2-2- Détermination de la concentration de l'ADN

La concentration de l'ADN est déterminée par mesure de la densité optique (DO) à 260 nm (A260).

La valeur  $A_{260} = 1$  (= DO 1,0) correspond à environ 50 µg/ml d'ADN bicaténaire.

- En vue de déterminer le degré de contamination de l'ADN par des protéines, on peut procéder en complément à une mesure à 280 nm et calculer le quotient  $A_{260}/A_{280}$ .
- L'ADN pur donne un quotient de 1,8 ou plus.
- Un quotient  $A_{260}/A_{280}$  inférieur à 1,8 → Indice en faveur d'une contamination de l'ADN par des protéines.
- Un quotient  $A_{260}/A_{280}$  égal à 1,5 → Le pourcentage de protéines de la préparation d'ADN est de l'ordre de 50 %.
- Un quotient  $A_{260}/A_{280}$  supérieure à 2 → Indice en faveur d'une contamination de l'ADN par l'ARN.

- ✓ La pureté et la concentration de l'ADN utilisé ont une importance décisive pour un résultat optimal du test de typage HLA.

### **2-3-Amplification par PCR-SSP (Polymerase Chain Réaction – Sequence Specific Primers)**

#### **2-3-1- Le principe de la PCR-SSP**

La technique de PCR-SSP est basée sur le principe que seules sont amplifiées les séquences d'ADN complémentaires des amorces spécifiques utilisées grâce à des polymérase ADN type thermostable. Ces couples d'amorces sont spécifiques d'un allèle ou d'un groupe d'allèles selon le degré de résolution du kit utilisé. La réaction de PCR, permet l'hybridation des couples d'amorces suivie par une amplification (résultat positif), et ceci, dans des conditions très précises de PCR. Les paires d'amorces non hybridées ne donnent pas d'amplification (résultat négatif). Le typage est déterminé par la présence ou l'absence du produit de PCR visualisé sur gel d'agarose avec Ethidium bromide sous UV.

#### **2-3-2- Les acteurs d'une réaction de PCR-SSP**

- L'ADN matrice: qui est généralement double brin, contenant le fragment à amplifier (exon 2 et 3 pour HLA classe 1 et exon 2 pour HLA classe 2).
- Les amorces: Ce sont de petits brins d'ADN d'environ 20 bases capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases, sur le brin d'ADN correspondant. Elles sont choisies de façon à flanquer la séquence à amplifier et elles sont spécifiques d'un allèle ou d'un groupe d'allèles à étudier (HLA A, B, C, DR, DQ, DP).
- Les nucléotides: Ce sont des éléments de base utilisés par la Taq polymérase pour synthétiser les brins d'ADN complémentaires. dATP, dGTP, dCTP, dTTP, doivent être rapportés en concentration égales.
- Le chlorure de magnésium (MgCl<sub>2</sub>): C'est un facteur critique de l'amplification, car le magnésium est nécessaire à la fois pour stabiliser les nucléotides et pour la réaction.
- La Taq polymérase: Une ADN polymérase résistante à l'ébullition et active à 75-80 °C, elle est dépourvue d'activités d'édition (5'→3' exonucléase et 3' 5' exonucléase), et est utilisée pour la réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction = PCR).

- ✓ Le typage HLA en biologie moléculaire repose principalement sur l'étude ciblée **des exons 2 et 3 pour la classe I et de l'exon 2 pour la classe II**, qui codent la poche de fixation des peptides, site d'interaction avec le récepteur des lymphocytes T.

### **2-3-3- Les amorces spécifiques d'allèles**

Les kits HLA SSP utilisés lors du stage expérimental sont : ABDR SSP (96 réactions de PCR), ABC SSP (93 réactions de PCR) et DQB SSP (8 réaction de PCR). Les figures qui représentent les solutions d'amorces spécifiques d'allèles, pré-aliquotées et lyophilisées aux parois des tubes PCR sont retrouvées en annexes (Annexe III).

### **2-3-4- Le contrôle interne**

Une paire d'amorces de contrôle interne positif est intégrée dans chaque puits. Celle-ci correspond à des régions conservées du gène d'hormone de croissance humaine, présent dans tous les échantillons d'ADN humain. En présence d'un produit de PCR spécifique des allèles HLA, le produit de la bande de contrôle interne positif peut être faible ou absent.

### **2-3-5- Présentation des kits de typage**

Les kits de typage contiennent des amorces de séquence spécifique lyophilisées et optimisées pour l'amplification par PCR des allèles HLA et du gène d'hormone de croissance humaine, du PCR Master Mix sans *Taq* polymérase ("Master Mix"), des films adhésifs, une notice d'utilisation, des informations techniques spécifiques du lot et une fiche de travail.

Chaque tube contient une solution d'amorces lyophilisées spécifiques de groupe d'allèles, ainsi qu'une paire d'amorces de contrôle interne positif correspondant aux séquences non alléliques, prêt à recevoir l'échantillon d'ADN, le Master Mix et l'H<sub>2</sub>O.

Chaque plaque de typage contient un puit de contrôle négatif qui détecte la présence des produits de PCR correspondant à plus de 95% des amplicons générés avec les kits *HLA SSP*.

### 2-3-6- Réalisation d'un typage HLA SSP

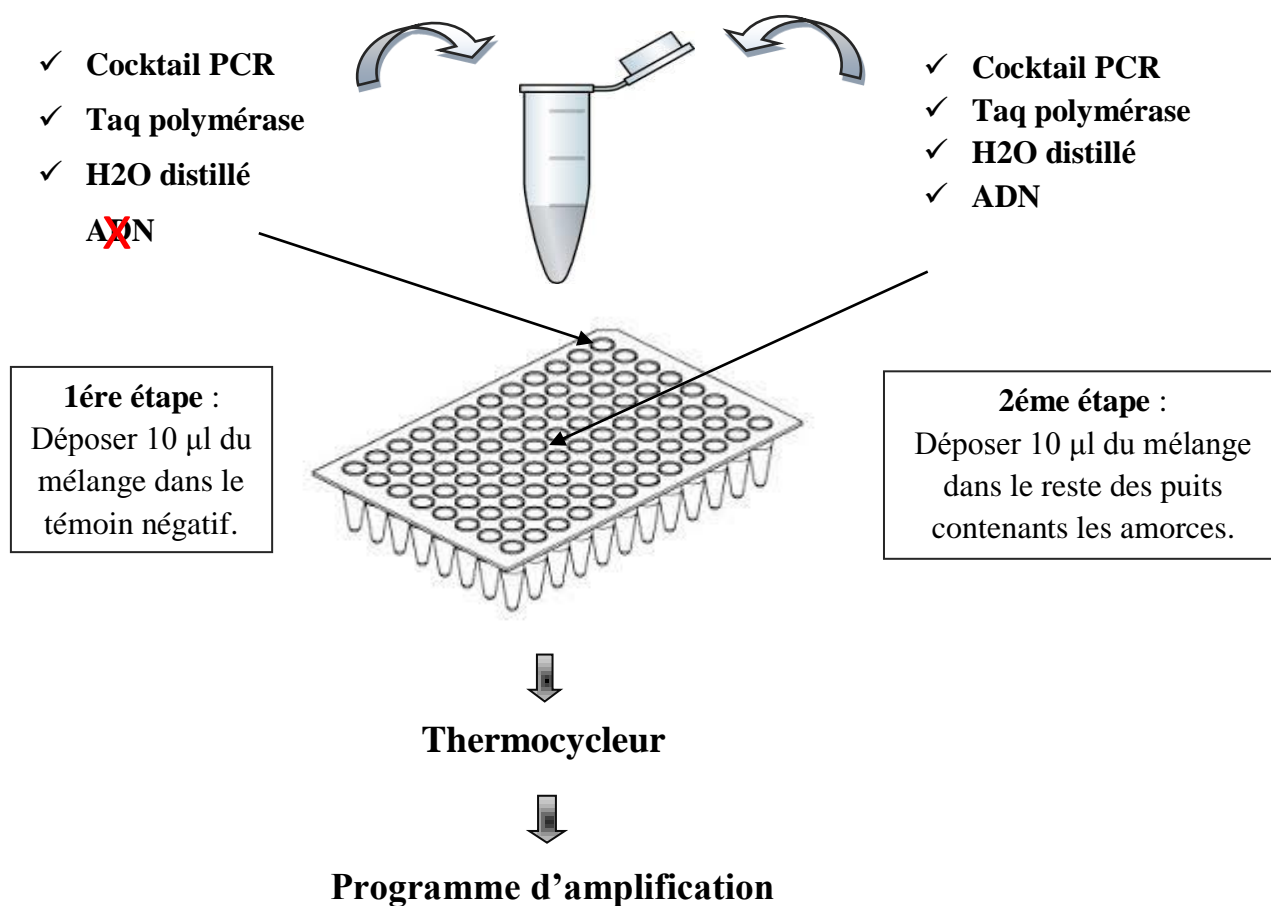
Trois kits de typage HLA différents, ont été utilisés : ABDR SSP (96 réactions de PCR), ABC SSP (93 réactions de PCR) et DQB SSP (8 réaction de PCR).

- Pour un typage HLA d'un échantillon d'ADN, les réactions de PCR sont réalisées avec un volume de 10 µl pour chaque tube de PCR.
- Pour chaque typage, préparer un mélange-mère des composants suivants dans un tube eppendorf : Cocktail de PCR, Taq ADN polymérase, dH<sub>2</sub>O.

**Tableau N° 08** : Les volumes à préparer en fonction du nombre des tubes PCR

Nombre de réaction PCR	8	18	24	48	96
<b>Cocktail PCR</b>	44 µl	100 µl	120 µl	228 µl	440 µl
<b>Taq polymérase</b>	0.7 µl	1.5 µl	1.8 µl	3.5 µl	7 µl
<b>H<sub>2</sub>O distillé</b>	55 µl	125 µl	150 µl	288 µl	550 µl
<b>ADN</b>	11 µl	25 µl	30 µl	57 µl	110 µl

Distribuer chaque fois 10 µl de ce mélange-mère dans les mélanges d'amorces spécifiques séchées. De préférence utiliser une multipipette a fin d'éviter une contamination des amorces, faire attention à ce que l'extrémité de la pipette n'entre pas en contact avec les amorces. Pour cela déposer le mélange-mère sur la paroi du tube. Fermer hermétiquement les barrettes de PCR. Placer la plaque dans le thermocycleur et débiter la PCR avec le programme HLA SSP.



**Figure N°12 :** Etape de pré amplification et amplification de l'ADN génomique par PCR-SSP

**Tableau N°09 :** Programme d'amplification

Etape de programme	T°	Durée	Nombre de cycles
<b>Dénaturation initiale</b>	94°C	2 min	
<b>Dénaturation</b>	94°C	10s	10 cycles
<b>Hybridation et elongation</b>	65°C	60s	
<b>Dénaturation</b>	94°C	10s	20 cycles
<b>Hybridation</b>	61°C	50s	
<b>Elongation</b>	72°C	30s	

**Remarque :** Plusieurs types de kit de typage HLA sont disponibles : HLA-A SSP (24 réactions de PCR), HLA-B SSP (48 réactions de PCR), HLA-C SSP (18 réactions de PCR), DRB SSP (24 réactions de PCR), DQB SSP (08 réactions de PCR), ABDR SSP (96 réactions de PCR), ABC SSP (93 réactions de PCR).

### **2-4- Electrophorèse de l'ADN amplifié sur gel d'agarose:**

Après la PCR, les fragments d'ADN amplifiés sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose, visualisés par colorisation au bromure d'éthidium sous lumière UV, puis photographiés et interprétés. L'interprétation des résultats de PCR-SSP se base sur la présence ou l'absence de produit(s) spécifique(s) de PCR.

#### **2-4-1- Préparation des réactifs (Annexe II)**

#### **2-4-2- Réalisation de la technique**

**Préparation du gel d'agarose :** Porter à ébullition l'agarose dans le TBE 1x jusqu'à dissolution complète. Laisser refroidir la solution à une température  $< 60^{\circ}$  C en agitant et ajouter la solution de bromure d'éthidium. Verser ensuite la solution d'agarose sans faire de bulles d'air dans le support de gel préparé et étanche. Mettre en place des peignes pour créer des puits de 10  $\mu$ l et laisser reposer pendant au moins 10 minutes à température ambiante.

Par la suite, placer le gel dans la chambre à gel puis étirer les peignes et recouvrir le gel de TBE 1X. Les puits du gel doivent être complètement recouverts de tampon. Distribuer la totalité de la préparation PCR (10  $\mu$ l) dans les puits du gel a fin de contrôler la taille des produits de PCR. L'électrophorèse se fait pendant 15 à 25 minutes.

- Au terme de l'électrophorèse le gel est placé sur un transilluminateur UV et photographié afin d'interpréter et documenter les résultats.

### 2-4-3- Interprétation des résultats

Les mélanges d'amorces HLA contiennent des amorces témoins qui amplifient un fragment de l'hormone de croissance de l'homme (human growth hormone, HGH).

Ces amorces présentent une concentration plus faible que les paires d'amorces spécifiques des allèles et servent de contrôle interne de l'amplification. Cette amplification témoin a généralement toujours lieu, c'est-à-dire aussi bien en présence qu'en l'absence d'un fragment de PCR spécifique d'un allèle ou d'un groupe. La bande témoin est donc visible dans toutes les prises d'essai d'amplification génique. En présence d'un produit de PCR spécifique d'un groupe HLA, la bande témoin peut être faible ou totalement absente. Ceci ne constitue pas une limite du test, car la bande spécifique retrouvée témoigne dans de tels cas du déroulement correct de l'amplification.

L'interprétation du test repose sur le fait de savoir si une bande d'ADN spécifique est présente dans le gel ou non. La taille des fragments amplifiés d'ADN ne devra pas nécessairement être prise en compte, mais pourra l'être à titre d'aide lors de l'interprétation.

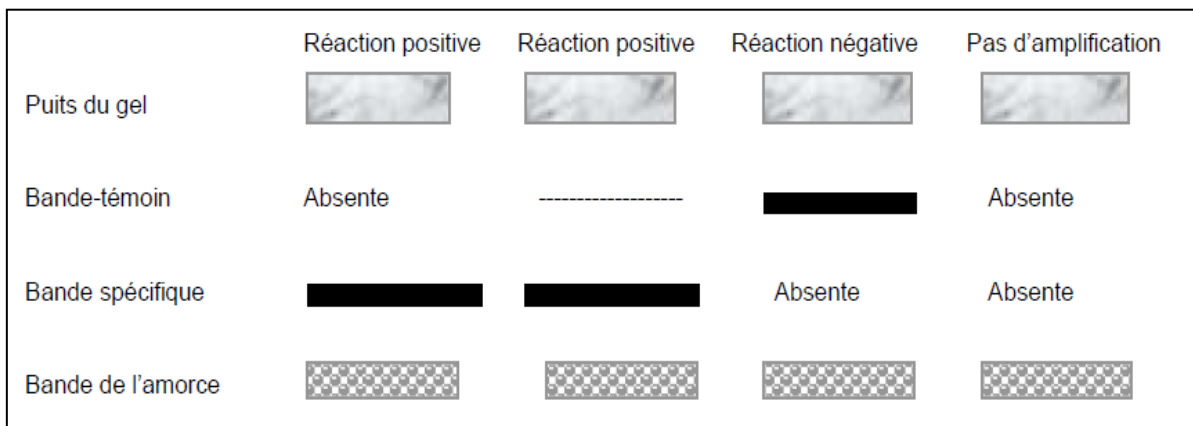


Figure N°13 : Interprétation des résultats

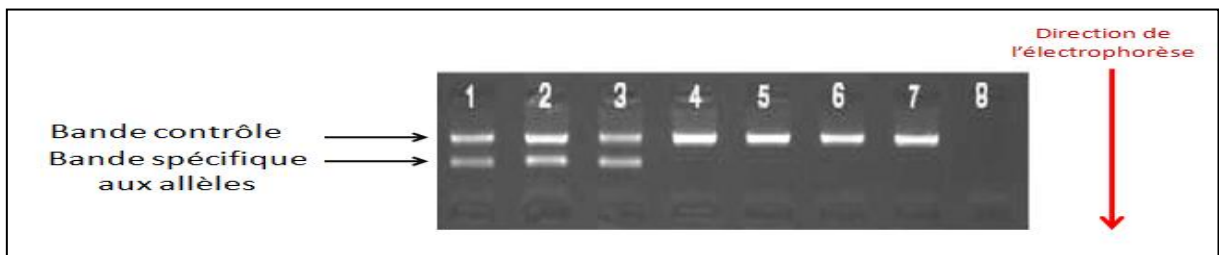


Figure N°14 : Lecture des bandes

### **3- Etudes statistique:**

Les fréquences alléliques sont évaluées par un dénombrement sur Microsoft Excel. Pour la comparaison, Les distributions des fréquences relatives des divers allèles de type A et B ont été calculées. Les fréquences de ces allèles trouvées en Algérie et celles des autres pays (Maroc, Tunisie, Italie, France, Pays basque, Chine et Brésil) ont été comparées par des tests de comparaison de pourcentages. Les différences ont été jugées significatives à  $p < 0.05$ . Des analyses en composantes principales (ACP) ont permis de mettre en évidence les pays présentant le plus de similarités, globalement et par allèle. L'analyse statistique a été établie sur Statistica 10, Statsoft, Inc., Tulsa, OK, USA.

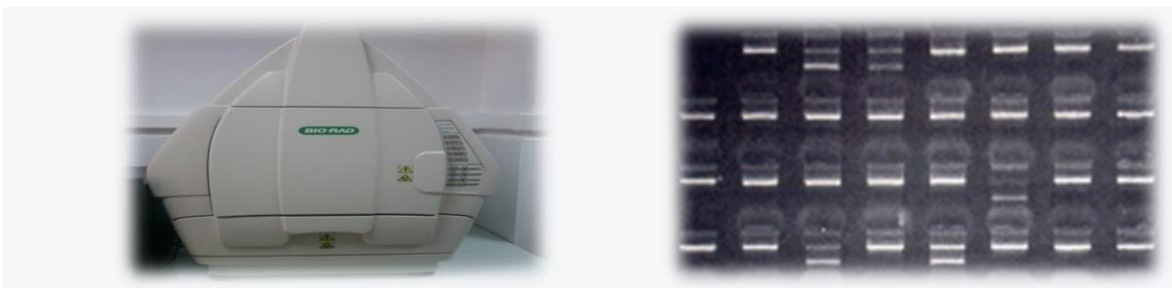




Extraction de l'ADN par la méthode « salting out »



1. Distribution dans chaque puits du mélange-mère (Taq poly, H<sub>2</sub>O, ADN, cocktail PCR) dans les mélanges d'amorces spécifiques séchées.
2. Amplification spécifique de l'allèle si présent, par le thermocycleur.
3. Révélation de l'ADN amplifié sur gel d'agarose



Le typage est déterminé par la présence ou l'absence du produit de PCR visualisé sur gel d'agarose avec Ethidium bromide sous UV.

**Figure N°15 : Schéma récapitulatif des méthodes effectuées au cours du stage expérimental.**

# Résultats et discussion

### 1- Résultats

#### 1-1- Le typage HLA :

L'image ci-dessous représente le résultat correspondant à un échantillon pour lequel le typage HLA a été réalisé par le kit de typage HLA SSP : ABDR SSP (96 réactions de PCR).

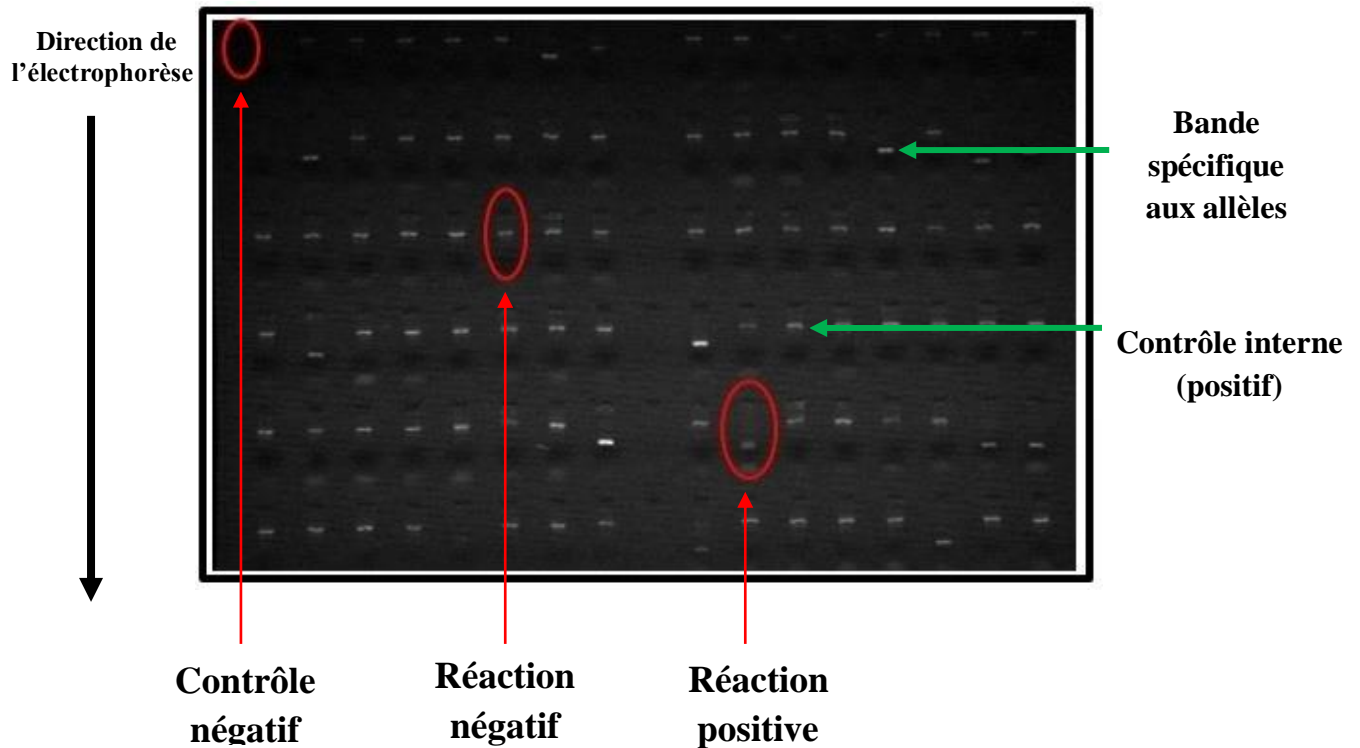


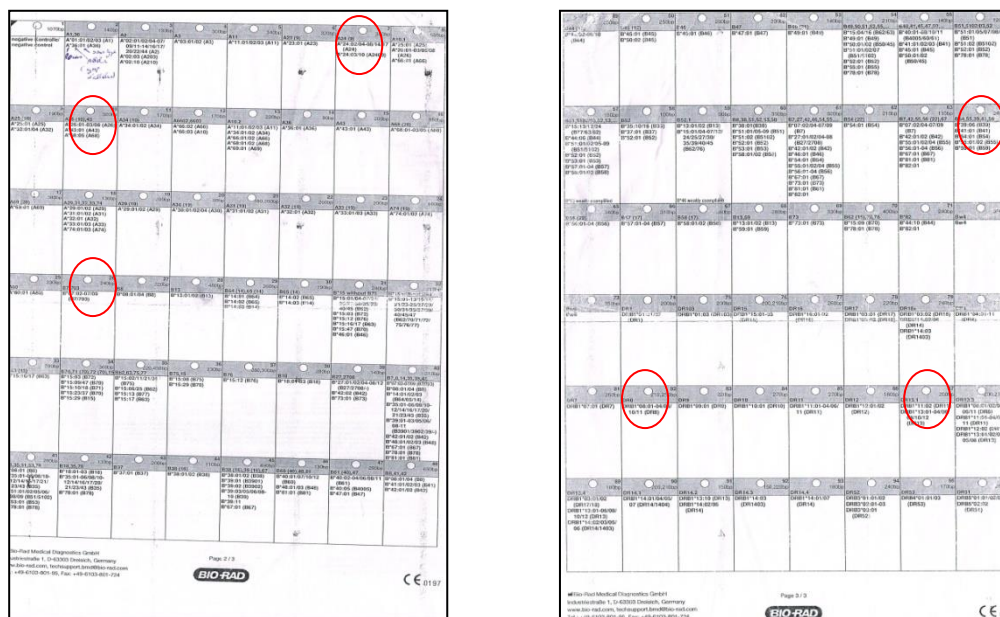
Figure N°16 : Visualisation des bandes sur le gel d'électrophorèse après amplification.

#### Interprétation des résultats :

- **Le contrôle négatif** : Absence d'amplification génique (ni contrôle interne ni la bande positive) → Absence de l'ADN matrice.
- **Le contrôle interne (positif)** : Présence et visibilité de la bande témoin (contrôle interne) dans toutes les prises d'essai d'amplification génique → Présence d'une paire d'amorces intégrée dans chaque puits et qui correspond à des régions conservées du gène d'hormone de croissance humaine, présent dans tous les échantillons d'ADN humain.
- **Réaction négative** : Présence de bandes contrôle et absence de bandes spécifiques aux allèles.
- **Réaction positive** : Présence de bandes spécifiques aux allèles et de bandes contrôle.

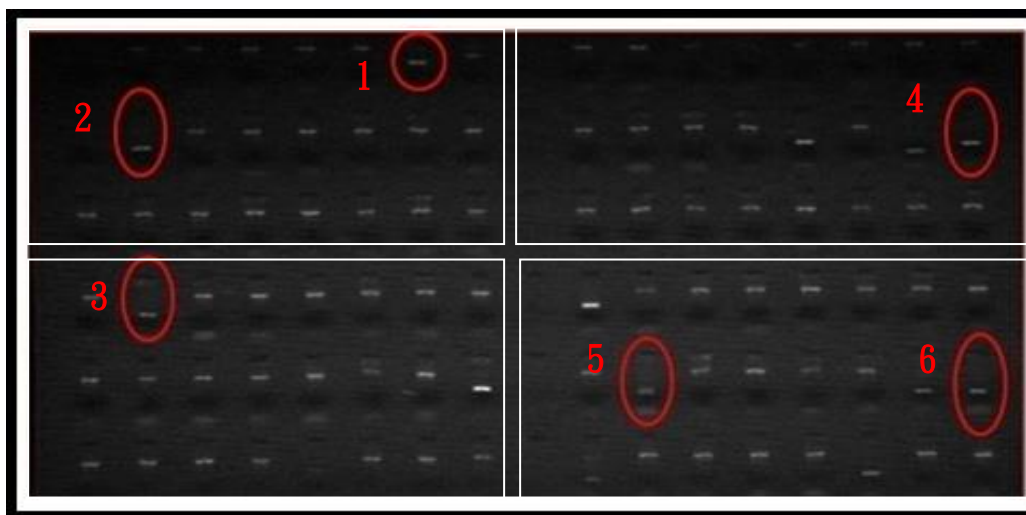
## Résultats et discussion

(Les images plus claires sont retrouvées en annexe « Annexes III »).



Locus A

Locus B



Locus B

Locus DR

HLA classe I et II	Locus A	A*24	A*26
	Locus B	B*07	B*39
	Locus DR	DRB1*08	DRB1*13

Figure N°19 : Résultats du typage des antigènes HLA par biologie moléculaire « PCR- SSP »

### 1-2- Fréquences alléliques :

Les fréquences des allèles HLA-A, -B, -C, -DR et -DQ observées chez 271 Algériens sont représentés dans les tableaux 10 et 11.

**Tableau N°10 :** Fréquence des allèles HLA-A, B et C observées en Algérie (271 patients typés par PCR-SSP)

Locus A (n = 210)		Locus B (n=209)		Locus C (n=155)	
Allèle	Fréquence (%)	Allèle	Fréquence (%)	Allèle	Fréquence (%)
A*01	10.7	B*07	6.06	C*01	0.9
A*02	21.6	B*08	4.3	C*02	7.7
A*03	10.9	B*13	1.7	C*03	3.5
A*11	3.1	B*14	4.3	C*04	12.9
A*23	4.0	B*18	5.5	C*05	7.4
A*24	6.6	B*27	2.1	C*06	14.2
A*25	0.7	B*35	6.06	C*07	19.7
A*26	5.4	B*37	0.7	C*08	3.8
A*29	4.05	B*38	3.8	C*12	7.7
A*30	9.5	B*39	0.9	C*14	2.2
A*31	2.1	B*40	3.3	C*15	8.4
A*32	5.9	B*41	2.9	C*16	8.4
A*33	4.05	B*42	1.9	C*17	2.5
A*34	0.4	B*44	8.4		
A*66	0.9	B*45	2.6		
A*68	7.3	B*49	4.6		
A*74	1.1	B*50	10.1		
		B*51	7.5		
		B*52	4.3		
		B*53	4.1		
		B*55	0.9		
		B*57	2.6		
		B*58	4.1		

## Résultats et discussion

Vingt allèles HLA-A ont été identifiés au cours de notre étude dont le pourcentage d'hétérozygotie est de 90.04 %. L'allèle A\*02 est le plus fréquent (21.6 %) suivie par A\*03 (10.9 %), A\*01 (10.7 %) et A\*30 (9.5 %). Certains allèles sont rares tel que A\*34 (0.4 %) et d'autres sont introuvables tel que A\*36.

Pour le locus HLA-B, vingt six allèles ont été identifiés, et le pourcentage d'hétérozygotie été de 89.54 %. L'allèle le plus fréquent est HLA-B\*50 (10,1 %) suivie par -B\*44 (8.4 %) et -B\*51 (7.5 %). Certains allèles sont rares tel que -B\*55 (0.9 %) et -B\*37 (0.7 %) et d'autres sont introuvables tel que - B\*87, -B\*81 et -B\*82.

Treize allèles HLA-C ont été identifiés avec un pourcentage d'hétérozygotie de 84.5 %. L'allèle le plus fréquemment rencontré est HLA-C\*07 (19.7 %) suivie par -C\*06 (14.2 %), -C\*04 (12.9 %) et -C\*16 (8.4 %). Les allèles -C\*14 et -C\*01 sont représentés avec des fréquences base, 2.2 % et 0.9 % respectivement.

**Tableau N°11 : Fréquence des allèles HLA-DR et DQ observées en Algérie**

(271 patients typés par PCR-SSP)

Locus DRB1 (n= 202)		Locus DQB1 (n=141)	
Allèle	Fréquence (%)	Allèle	Fréquence (%)
DRB1*01	8.2	<b>DQB1*02</b>	<b>33.0</b>
<b>DRB1*03</b>	<b>19.5</b>	DQB1*03	25.2
DRB1*04	16.4	DQB1*06	21.7
DRB1*07	13.1	DQB1*05	14.9
DRB1*08	1.9	DQB1*04	04.9
DRB1*09	0.7		
DRB1*10	0.9		
DRB1*11	11.4		
DRB1*12	1.9		
DRB1*13	11.4		
DRB1*14	2.7		
DRB1*15	11.6		

Douze allèles HLA-DRB1 ont été identifiés au cours de notre étude dont le pourcentage d'hétérozygotie est de 83.2%. L'allèle le plus représenté est HLA-DRB1\*03 (19.5 %) suivie par -DRB1\*04 (16.4%) et -DRB1\*07 (13.01%), certains allèles sont rares tel que -DRB1\*10 (0.9%) et -DRB1\*09 (0.7 %).

Et en fin, pour le locus HLA-DQB1, cinq allèles ont été identifiés, et le pourcentage d'hétérozygotie été de 80.14 %. L'allèle le plus fréquent est HLA-DQB1\*02 (33.0%) suivie par -DQB1\*03 (25%) et -DQB\*06 (21.7%), l'allèle -DRB1\*04 été le moins fréquent avec une fréquence de 4.9%.

### **1-3- Relation génétique :**

Afin d'étudier les relations génétiques entre la population Algérienne et d'autres populations, une comparaison détaillée a été effectuée indépendamment pour les allèles HLA-A, -B, et DRB1. Les populations utilisées pour l'étude comparative sont : les populations maghrébines (Maroc, Tunisie), populations de l'Europe occidentale, (France, Pays basques, Italie), et des populations lointaines (Chine et Brésil).

Les fréquences des allèles HLA-A, -B, -DR, observées chez les populations utilisées pour l'étude comparative sont présentés dans les **Tableaux 12 et 13, 14**, et les résultats de comparaison entre l'Algérie et ces derniers sont présentés dans les **Tableaux 15, et 16**.

**Tableau N°12 :** Exemples de fréquences alléliques (Human Leucocyte Antigen HLA-A ) observées chez des populations différents (Brick et al ., **2015** ; Mahfoudh N et al ., **2013** ; Rendine et al ., **2012** ; Cesbron et al ., **2015** ; Sanchez et al ., **2003** ; Chun-mei Shen et al ., **2010** ; Luana de Cassia et al ., **2014**).

Allèle HLA-A	Fréquence génique (%)						
	Maroc (n=647)	Tunisie (n=123)	Italie (n=975)	France (n=256)	Pays basque (n=83)	Chine (n=10 000)	Brésil (n=3542)
A01	12,5	15,0	10,1	13,6	19,2	4,4	8,8
A02	19,2	21,5	26,3	25,0	16,0	29,7	26,3
A03	8,7	6,1	11,6	15,4	10,7	4,7	9,4
A11	3,3	5,6	4,5	5,2	16,0	18,7	5,5
A23	6,9	4,8	2,1	2,9	1,3	0,4	4,5
A24	6,5	8,9	13,3	10,9	12,0	15,7	9,8
A25	0,4	-	1,6	2,1	2,7	0,0	1,2
A26	2,9	2,4	4,0	3,7	4,7	3,1	3,4
A29	3,4	4,8	2,0	5,6	8,0	1,4	4,2
A30	10,0	7,7	5,3	3,3	3,3	5,5	5,8
A31	1,3	1,2	2,6	2,1	1,3	4,0	4,2
A32	4,1	5,6	3,6	2,9	-	1,7	3,4
A33	5,3	2,8	2,0	0,7	0,7	8,5	2,9
A34	1,5	2,4	-	0,2	0,7	0,1	0,6
A66	1,2	-	-	0,5	0,7	0,05	0,7
A68	6,1	9,3	3,3	4,3	1,3	1,5	5,5
A69	0,2	-	-	-	-	0,1	0,1
A74	0,5	0,04	-	0,2	-	0,1	0,8

L'allèle HLA-A le plus fréquemment rencontré été HLA-A2, pour toute les populations d'étude avec des fréquences élevées qui varient entre 19.2% et 29.7%, sauf pour les Basques, ou il a été trouvé en deuxième position après l'allèle HLA-A\*01.



## Résultats et discussion

**Tableau N°13 :** Exemples de fréquences alléliques (Human Leucocyte Antigen [HLA]-B) observées chez des populations différents (Brick et al ., **2015** ; Mahfoudh N et al ., **2013** ; Rendine et al ., **2012** ; Cesbron et al ., **2015** ; Sanchez et al ., **2003** ; Chun-mei Shen et al ., **2010** ; Luana de Cassia et al ., **2014**).

Allèle HLA-B	Fréquence génique (%)						
	Maroc (n=567)	Tunisie (n=123)	Italie (n=1643)	France (n=256)	Pays basque (n=83)	Chine (n=10 000)	Brésil (n=3542)
B07	6,4	4,8	4,0	13,1	12,6	4,2	6,1
B08	6,1	7,3	4,0	8,5	12,05	1,3	5,0
B13	1,9	4,4	2,1	1,7	-	10,7	2,0
B14	5,2	4,4	6,9	-	2,0	0,02	5,1
B15	5,2		6,5	-	2,6	0,3	7,8
B18	5,8	2,8	5,8	8,1	5,3	0,5	5,1
B27	1,7	1,2	1,5	3,9	0,6	1,8	2,4
B35	6,5	9,7	18,1	6,8	6,02	5,8	12,0
B37	0,8	0,4	1,1	0,7	-	1,9	1,1
B38	3	1,2	2,8	0,7	-	2,9	2,1
B39	1	0,8	1,6	2,3	2,6	1,7	3,2
B40	2,1	5,6	3,5	-	5,3	0,06	4,7
B41	3,3	4,0	-	0,5	-	0,1	1,3
B42	1,2	1,6	-	-	-	0,03	1,2
B44	12,4	11,7	6,0	15,6	24,0	5,0	10,6
B45	2,2	3,2	-	0,2	-	0,1	1,4
B49	7,1	4,8	4,2	3,9	5,3	0,2	2,8
B51	6,1	7,7	2,2	1,7	-	0,8	2,7
B52	5,7	4,8	8,0	7,5	7,3	7,6	8,3
B53	1,9	5,2	1,2	0,5	4,6	3,5	1,9
B55	3,2	2,4	-	-	3,3	0,01	2,1
B57	0,5	1,6	1,3	1,9	1,3	2,04	0,9
B58	2,1	1,6	2,4	2,5	2,0	1,4	2,9

L'allèle HLA-B le plus fréquent est HLA-B44 chez les Marocains (12.4%), Tunisiens (11.79%), les Basques (24%) et les français (15.68%), -B35 chez les Italiens (18.1%), et les Brésiliens (12%), et -B13 chez les chinois (10.76%).

Donc, les résultats montrent une prédominance de l'allèle HLA-B44 chez les populations méditerranéennes.

**Tableau N°14 :** Exemples de fréquences alléliques (Human Leucocyte Antigen [HLA]-DRB1) observées chez des populations différents (Brick et al ., **2015** ; Mahfoudh N et al ., **2013** ; Rendine et al ., **2012** ; Cesbron et al ., **2015** ; Sanchez et al ., **2003** ; Chun-mei Shen et al ., **2010** ; Luana de Cassia et al ., **2014**).

Allèle HLA-DR	Fréquence génique (%)						
	Maroc (n=647)	Tunisie (n=123)	Italie (n=975)	France (n=256)	Pays basque (n=83)	Chine (n=10 000)	Brésil (n=3542)
DR01	6.4	9.8	8.9	10.1	5.4	4.1	10.0
DR03	16.9	13.8	9.2	<b>25,0</b>	17.3	0.3	9.2
DR04	<b>18.4</b>	<b>16.3</b>	7.1	12.5	11.4	11.2	9.2
DR07	13.0	15.4	12.4	12.0	<b>31.3</b>	10.7	<b>14.9</b>
DR08	3.1	3.7	2.1	3.1	0	5.8	4.7
DR09	0.8	1.6	-	1.5	0	13.1	1.5
DR10	2.3	2.4	1.9	0.5	1.3	1.8	1.8
DR11	7.7	12.6	<b>23.5</b>	14.0	8	7.1	12.9
DR12	0.5	1.2	1.2	1.5	-	11.0	1.7
DR13	11.3	10.2	6.6	13.6	8.7	5.6	12.9
DR14	2.2	2.8	5.2	3.3	-	6.9	4.3
DR15	11.4	8.5	1.3	12.9	16.7	<b>15.5</b>	11.1

L'allèle HLA-DRB1 le plus fréquent est -DRB1\*04 chez les Marocains (18.4%) et les Tunisiens (16.3%), -DRB1\*11 chez les Italiens (23.5%), -DRB1\*07 chez les Basques (31%) et les Brésiliens (14.9%) et DRB1\*15 chez les chinois (15.5 %).

L'allèle DRB1, connu par son extrême polymorphisme est distribué de façon très variable dans les différentes populations.

**Tableau N°15 : Comparaison entre la population Algérienne et autres populations, basée sur la fréquence des allèles HLA-A**

Allèle A	Algérie (n=210)	Maroc (n=647)	P	Tunisie (n=123)	P	Italie (n=975)	P	France (n=256)	P
1	10,7	12,5	<b>0,33</b>	15,0	<b>0.10</b>	10,1	<b>0.73</b>	13,6	<b>0.17</b>
2	21,6	19,2	<b>0,27</b>	21,5	<b>0.97</b>	26,3	<b>0.05</b>	25,0	<b>0.23</b>
3	10,9	8,7	<b>0,17</b>	6,1	<b>0.04</b>	11,6	<b>0.69</b>	15,4	<b>0.05</b>
11	3,1	3,3	<b>0,84</b>	5,6	<b>0.10</b>	4,5	<b>0.18</b>	5,2	<b>0.10</b>
23	4,0	6,9	<b>0,04</b>	4,8	<b>0.63</b>	2,1	<b>0.02</b>	2,9	<b>0.35</b>
24	6,6	6,5	<b>0,90</b>	8,9	<b>0.28</b>	13,3	<b>&lt;0,001</b>	10,9	<b>0,03</b>
25	0,7	0,4	<b>0,42</b>			1,6	<b>0,14</b>	2,1	<b>0,07</b>
26	5,4	2,9	<b>0,01</b>	2,4	<b>0.06</b>	4,0	<b>0,19</b>	3,7	<b>0,20</b>
29	4,0	3,4	<b>0,53</b>	4,8	<b>0.61</b>	2,0	<b>0,015</b>	5,6	<b>0,26</b>
30	9,5	10,0	<b>0,77</b>	7,7	<b>0.43</b>	5,3	<b>0,001</b>	3,3	<b>&lt;0,001</b>
31	2,1	1,3	<b>0,22</b>	1,2	<b>0.39</b>	2,6	<b>0,57</b>	2,1	<b>0,99</b>
32	5,9	4,1	<b>0,11</b>	5,6	<b>0.89</b>	3,6	<b>0,034</b>	2,9	<b>0,024</b>
33	4,0	5,3	<b>0,31</b>	2,8	<b>0.42</b>	2,0	<b>0,012</b>	0,7	<b>&lt;0,001</b>
34	0,4	1,5	<b>0,10</b>	2,4	<b>0.03</b>			0,2	<b>0,46</b>
66	0,9	1,2	<b>0,67</b>					0,5	<b>0,53</b>
68	7,3	6,1	<b>0,35</b>	9,3	<b>0.37</b>	3,3	<b>&lt;0,001</b>	4,3	<b>0,04</b>
69	0,7	0,2	<b>0,11</b>						
74	1,1	0,5	<b>0,13</b>	0,04	<b>0.10</b>			0,2	<b>0,06</b>

Allèle A	Algérie (n=210)	Pays basque (n=83)	P	Chine (n=10 000)	P	Brésil (n=3542)	P
1	10,7	19,2	<b>0.006</b>	4,4	<b>&lt;0,001</b>	8,8	<b>0.18</b>
2	21,6	16,0	<b>0.14</b>	29,7	<b>&lt;0,001</b>	26,3	<b>0.04</b>
3	10,9	10,7	<b>0.97</b>	4,7	<b>&lt;0,001</b>	9,4	<b>0.29</b>
11	3,1	16,0	<b>&lt;0,001</b>	18,7	<b>&lt;0,001</b>	5,5	<b>0.03</b>
23	4,0	1,3	<b>0.08</b>	0,4	<b>&lt;0,001</b>	4,5	<b>0.66</b>
24	6,6	12,0	<b>0,03</b>	15,7	<b>&lt;0,001</b>	9,8	<b>0,035</b>
25	0,7	2,7	<b>0,09</b>	0,05	<b>&lt;0,001</b>	1,2	<b>0,36</b>
26	5,4	4,7	<b>0,75</b>	3,1	<b>0,006</b>	3,4	<b>0,025</b>
29	4,0	8,0	<b>0,06</b>	1,4	<b>&lt;0,001</b>	4,2	<b>0,87</b>
30	9,5	3,3	<b>0,008</b>	5,5	<b>&lt;0,001</b>	5,8	<b>0,002</b>
31	2,1	1,3	<b>0,45</b>	4,0	<b>0,05</b>	4,2	<b>0,038</b>
32	5,9			1,7	<b>&lt;0,001</b>	3,4	<b>0,006</b>
33	4,0	0,7	<b>0,03</b>	8,5	<b>0,001</b>	2,9	<b>0,17</b>
34	0,4	0,7	<b>0,85</b>	0,1	<b>0,09</b>	0,6	<b>0,74</b>
66	0,9	0,7	<b>0,68</b>	0,05	<b>&lt;0,001</b>	0,7	<b>0,57</b>
68	7,3	1,3	<b>0,003</b>	1,5	<b>&lt;0,001</b>	5,5	<b>0,11</b>
69	0,7			0,1	<b>&lt;0,001</b>	0,1	<b>&lt;0,001</b>
74	1,1			0,1	<b>&lt;0,001</b>	0,8	<b>0,39</b>

### **1-3-1- Comparaison sur la base du locus HLA-A**

#### **1-3-1-1- La comparaison avec les populations Maghrébines :**

La comparaison entre Algérie et Maroc a montré qu'il existe une différence significative seulement pour HLA-A23 avec fréquence plus élevée au Maroc (6,9%) contre (4,1%) en Algérie «  $p=0,04$  ». et l'allèle HLA-A26 avec fréquence plus basse au Maroc (2,9%) contre (5,5%) en Algérie «  $p=0,01$  », alors que les fréquences pour tous les autres allèles sont comparables ( $0.10 < P < 0.90$ ). La comparaison entre Algérie et Tunisie a montré qu'il existe une différence significative seulement pour HLA-A03 avec fréquence plus basse en Tunisie (6,1%) contre (11%) en Algérie «  $p=0,04$  » et HLA-A34 avec fréquence plus élevée en Tunisie (2,4%) contre (0,5%) en Algérie «  $p=0,03$  », alors que les fréquences pour tous les autres allèles sont comparables ( $0.10 < P < 0.97$ ).

#### **1-3-1-2- La comparaison avec des populations de l'Europe occidentale :**

La comparaison des allèles du locus HLA-A entre l'Algérie et l'Italie a montré qu'il existe une différence significative pour 7 allèles : A\*23 «  $p=0.02$  », A\*24 «  $p<0.001$  », A\*29 «  $p=0.015$  », A\*30 «  $p=0.001$  », A\*32 «  $p=0.034$  », A\*33 «  $p=0.012$  » et A\*68 «  $p<0.001$  ». Les fréquences pour tous les autres allèles sont comparables ( $0.05 < p < 0.73$ ). La comparaison des allèles du locus HLA-A entre l'Algérie et la France a montré qu'il existe une différence significative pour 5 allèles : A\*24 «  $p=0.03$  », A\*30 «  $p<0.001$  », A\*32 «  $p=0.024$  », A\*33 «  $p<0.001$  » et A\*68 «  $p=0.04$  ». Les fréquences pour tous les autres allèles sont comparables ( $0.05 < p < 0.99$ ).

Une différence significative pour 5 allèles HLA-A a été observé par la comparaison avec les basques incluant HLA-A\*01 «  $p=0.006$  », A\*11 «  $p<0.001$  », A\*24 «  $p=0.03$  », A\*30 «  $p=0.008$  » et A\*68 «  $p=0.003$  », Les fréquences pour tous les autres allèles sont comparables ( $0.03 < p < 0.97$ ).

#### **1-3-1-3- Comparaison avec des populations lointaines :**

La comparaison pour l'allèle HLA-A a montré que la Chine se démarque des autres pays et présente le plus de différences très significatives avec l'Algérie ( $p<0.001$ ) sauf pour l'allèle A31 ( $p=0.05$  tout juste) et l'allèle A34 ( $p=0.09$ ) avec des fréquences comparables aux nôtres.

## Résultats et discussion

Pour le Brésil, la comparaison a donné des résultats qui semble être similaire a celle retrouvés avec les pays de l'Europe occidentale avec une différence significative pour 7 Allèles ( $0.001 < p < 0.04$ ), les fréquences pour les autres allèles sont comparables.

**Tableau N°16 :** Comparaison entre la population Algérienne et autres populations, basée sur la fréquence des allèles HLA-B

Allèle B	Algérie 206	Maroc 567	P	Tunisie 123	P	Italie 1643	P	France 256	P
7	6,0	6,4	<b>0.79</b>	4,8	<b>0.52</b>	4,0	<b>0.05</b>	13,1	<b>&lt;0.001</b>
8	4,3	6,1	<b>0.20</b>	7,3	<b>0.11</b>	4,0	<b>0.78</b>	8,5	<b>0.12</b>
13	1,7	1,9	<b>0.76</b>	4,4	<b>0.04</b>	2,1	<b>0.59</b>	1,7	<b>0.94</b>
14	4,3	5,2	<b>0.51</b>	4,4	<b>0.51</b>	6,9	<b>0.05</b>		
15	5,3	5,2	<b>0.91</b>			6,5	<b>0.36</b>		
18	5,5	5,8	<b>0.86</b>	2,8	<b>0.10</b>	5,8	<b>0.85</b>	8,1	<b>0.12</b>
27	2,1	1,7	<b>0.51</b>	1,2	<b>0.37</b>	1,5	<b>0.34</b>	3,9	<b>0.13</b>
35	6,07	6,5	<b>0.74</b>	9,7	<b>0.08</b>	18,1	<b>&lt;0.001</b>	6,8	<b>0.64</b>
37	0,73	0,8	<b>0.91</b>	0,4	<b>0.61</b>	1,1	<b>0.41</b>	0,7	<b>0.93</b>
38	3,88	3	<b>0.004</b>	1,2	<b>0.05</b>	2,8	<b>0.27</b>	0,7	<b>0.001</b>
39	0,97	1	<b>1.00</b>	0,8	<b>0.83</b>	1,6	<b>0.30</b>	2,3	<b>0.11</b>
40	3,40	2,1	<b>0.15</b>	5,6	<b>0.13</b>	3,5	<b>0.32</b>		
41	2,91	3,3	<b>0.73</b>	4,0	<b>0.42</b>			0,5	<b>0.006</b>
42	1,94	1,2	<b>0.30</b>	1,6	<b>0.77</b>				
44	8,50	12,4	<b>0.03</b>	11,7	<b>0.17</b>	6,0	<b>0.001</b>	15,6	<b>0.001</b>
45	2,67	2,2	<b>0.59</b>	3,2	<b>0.67</b>			0,2	<b>0.001</b>
49	4,61	7,1	<b>0.07</b>	4,8	<b>0.87</b>	4,2	<b>0.76</b>	3,9	<b>0.60</b>
50	10,19	6,1	<b>0.006</b>	7,7	<b>0.29</b>	2,2	<b>&lt;0.001</b>	1,7	<b>&lt;0.001</b>
51	7,52	5,7	<b>0.20</b>	4,8	<b>0.18</b>	8,0	<b>0.72</b>	7,5	<b>0.95</b>
52	4,37	1,9	<b>0.008</b>	5,2	<b>0.59</b>	1,2	<b>&lt;0.001</b>	0,5	<b>&lt;0.001</b>
53	4,13	3,2	<b>0.36</b>	2,4	<b>0.25</b>				
55	0,97	0,5	<b>0.34</b>	1,6	<b>0.46</b>	1,3	<b>0.56</b>	1,9	<b>0.23</b>
57	2,67	2,1	<b>0.52</b>	1,6	<b>0.39</b>	2,4	<b>0.77</b>	2,5	<b>0.90</b>
58	4,13	1,2	<b>&lt;0.001</b>	5,6	<b>0.36</b>	1,5	<b>&lt;0.001</b>	0,5	<b>&lt;0.001</b>

Allèle B	Algérie 206	Pays basque 83	P	Chine 10000	P	Brésil 3542	P
7	6,0	12,6	<b>0.008</b>	4,2	<b>0.07</b>	6,1	<b>0.98</b>
8	4,3	12,0	<b>&lt;0.001</b>	1,3	<b>&lt;0.001</b>	5,0	<b>0.001</b>
13	1,7			10,7	<b>&lt;0.001</b>	2,0	<b>0.67</b>
14	4,3	2,0	<b>0.14</b>	0,02	<b>&lt;0.001</b>	5,1	<b>0.51</b>
15	5,3	2,6	<b>0.12</b>	0,3	<b>&lt;0.001</b>	7,8	<b>0.07</b>
18	5,5	5,3	<b>0.94</b>	0,5	<b>&lt;0.001</b>	5,1	<b>0.67</b>
27	2,1	0,6	<b>0.19</b>	1,8	<b>0.62</b>	2,4	<b>0.78</b>

35	6,0	6,0	<b>0.98</b>	5,8	<b>0.84</b>	12,0	<b>&lt;0.001</b>
37	0,7			1,9	<b>0.08</b>	1,1	<b>0.48</b>
38	3,8			2,9	<b>0.28</b>	2,1	<b>0.02</b>
39	0,9	2,6	<b>0.18</b>	1,7	<b>0.23</b>	3,2	<b>0.01</b>
40	3,4	5,3	<b>0.26</b>	0,06	<b>&lt;0.001</b>	4,7	<b>0.22</b>
41	2,9			0,1	<b>&lt;0.001</b>	1,3	<b>0.007</b>
42	1,9			0,0	<b>&lt;0.001</b>	1,2	<b>0.19</b>
44	8,5	24,0	<b>&lt;0.001</b>	5,0	<b>0.001</b>	10,6	<b>0.18</b>
45	2,6			0,1	<b>&lt;0.001</b>	1,4	<b>0.04</b>
49	4,6	5,3	<b>0.68</b>	0,2	<b>&lt;0.001</b>	2,8	<b>0.03</b>
50	10,1			0,8	<b>&lt;0.001</b>	2,7	<b>&lt;0.001</b>
51	7,5	7,3	<b>0.90</b>	7,6	<b>0.90</b>	8,3	<b>0.58</b>
52	4,3	4,6	<b>0.81</b>	3,5	<b>0.37</b>	1,9	<b>&lt;0.001</b>
53	4,1	3,3	<b>0.52</b>	0,01	<b>&lt;0.001</b>	2,1	<b>0.007</b>
55	0,9	1,3	<b>0.8</b>	2,04	<b>0.13</b>	0,9	<b>0.88</b>
57	2,6	2	<b>0.54</b>	1,4	<b>0.05</b>	2,9	<b>0.80</b>
58	4,1			4,6	<b>0.61</b>	2,4	<b>0.03</b>

### 1-3-2- Comparaison sur la base du locus HLA-B

#### 1-3-2-1- La comparaison avec les populations Maghrébines :

Pour le locus HLA-B, la comparaison entre Algérie et Maroc a montré qu'il existe une différence significative pour 5 allèles HLA-B, alors que les fréquences pour tous les autres allèles sont comparables ( $0.07 < P < 1$ ). La comparaison entre Algérie et Tunisie a montré qu'il existe une différence significative seulement pour un seul allèle (HLA-B13) avec fréquence plus élevée en Tunisie (4.47%) contre (1.70%) en Algérie «  $p=0,04$ , les fréquences pour tous les autres allèles sont comparables ( $0.05 < P < 0.87$ ).

#### 1-3-2-2- La comparaison avec des populations de l'Europe occidentale :

Pour le locus HLA-B, la comparaison entre l'Algérie et l'Italie montrent l'existence d'une différence significative pour 5 allèles seulement HLA-B incluant HLA-B35, -B44, -B50, -B52, -B58 «  $p =$  ou  $< 0.001$  », et des fréquences comparables pour tous les autres allèles ( $0.05 < p < 0.85$ ).

La comparaison avec la France montre une différence significatif pour 8 allèles avec  $P=$  ou  $< 0.001$ . Et en fin pour les basques, il existe 3 allèles non comparables avec l'Algérie, dont la différence est hautement significative ( $0.001 < P < 0.008$ ).

#### 1-3-2-3- Comparaison avec des populations lointaines :

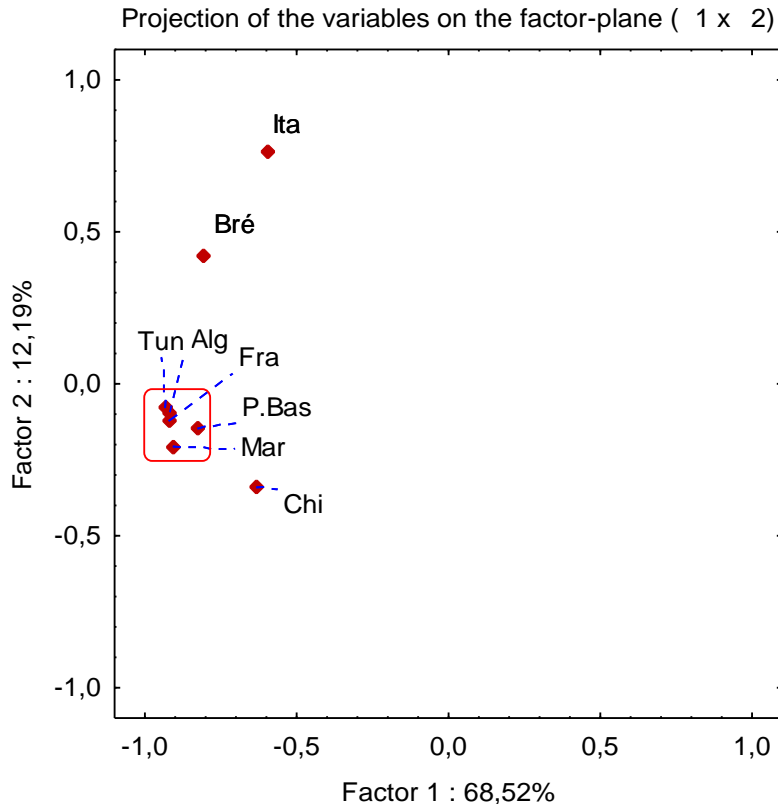
Egalement pour l'allèle HLA-B, la comparaison avec la chine a montré une différence significative pour un nombre très élevé d'allèles (13 allèles) avec un  $P=$  ou  $< 0.001$ .

Pour le Brésil, la comparaison a montré l'existence d'une différence pour un nombre élevé d'allèle par rapport celle retrouvées pour le locus HLA-A, avec une différence significative pour 11 allèles ( $0.001 < p < 0.04$ ).

### 1-4- Analyse en composantes principales (ACP)

A fin de cerner les pays présentant le plus de similarité dans la distribution des allèles HLA, une analyse en composantes principales (ACP) a été effectuée indépendamment pour le locus HLA-A, -B et -DRB1 suivie par une analyse sur la base des différents allèles. L'objectif de cette analyse est de revenir à un espace de dimension réduite en déformant le moins possible la réalité. Il s'agit donc d'obtenir le résumé le plus pertinent des données initiales. Il étudie sur le plan statistique l'ensemble des allèles en calculant par exemple l'écart-type, le minimum et le maximum de chaque variable...ect.

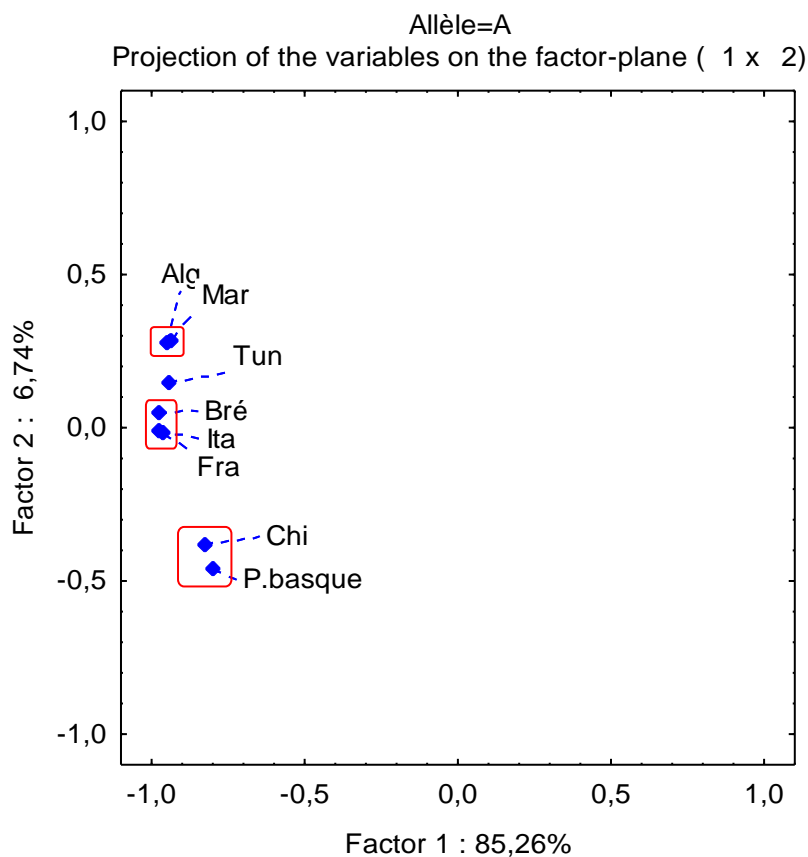
#### 1-4- 4- ACP basée sur les distributions des différents allèles :



**Figure N°18:** ACP tenant compte de la distribution des différents allèles

En se basant sur la distribution globale des allèles HLA, L'Algérie, Tunisie, Maroc, France et Pays basque s'aperçoivent dans le même groupe, La Chine, Brésil et Italie se positionnent loin de notre population.

### 1-4-1- ACP basée sur les distributions des allèles HLA-A



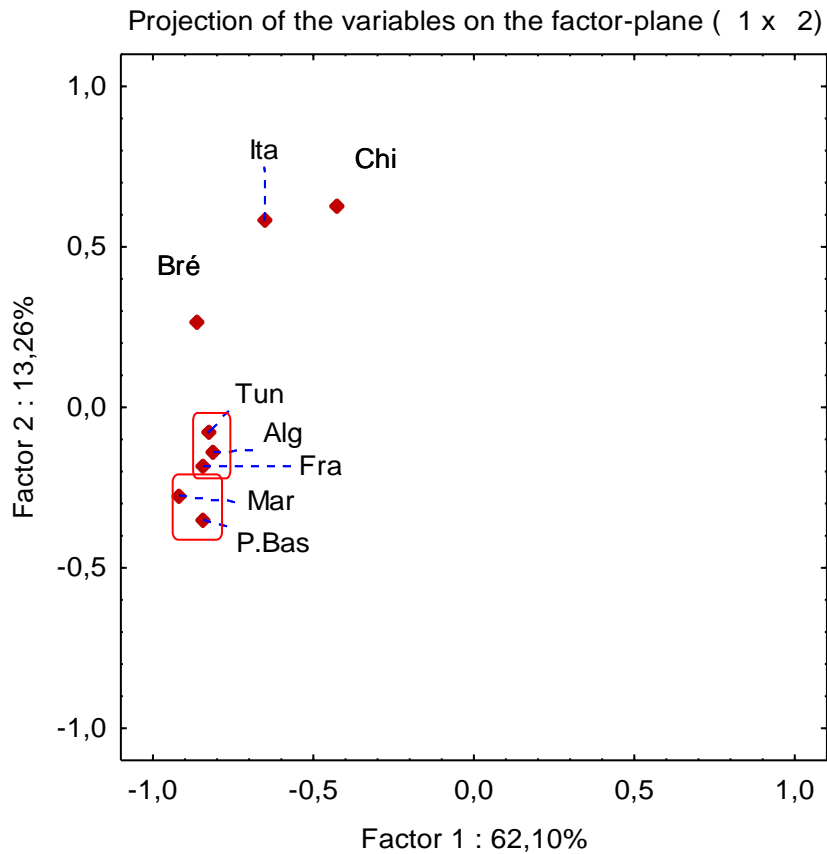
**Figure N°19 :** ACP tenant compte la distribution des allèles HLA-A par pays

Les groupes proches sont ceux des pays présentant des similarités pour la distribution des allèles HLA.

Pour l'allèle HLA-A, Le Maroc se rapproche le plus de l'Algérie, dont, les deux pays se regroupent dans un même point, La Tunisie prend une position proche à ces dernier. La France, l'Italie et le Brésil se regroupent ensemble, avec une similitude plus claire entre France et Italie. Et enfin La Chine et le Pays basque s'éloignent le plus de notre population.



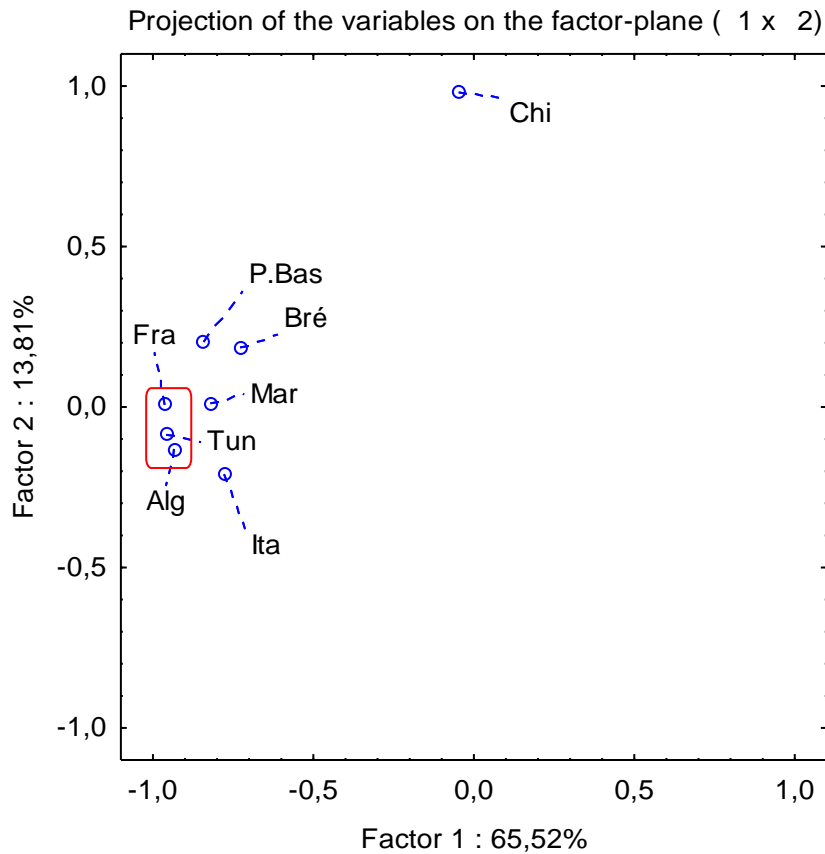
1-4-2- ACP basée sur les distributions des allèles HLA-B



**Figure N°20 :** ACP tenant compte de la distribution des allèles HLA-B par pays

Pour l'allèle HLA-B, Algérie, Tunisie et France s'aperçoivent dans le même groupe .Le Maroc et Pays basque constituent un autre groupe situé très proche à celle de l'Algérie. L'Italie et le Brésil s'éloignent, et la Chine s'éloigne le plus.

1-4-3- ACP basée sur les distributions des allèles HLA-DRB1



**Figure N°21** : ACP tenant compte de la distribution des allèles HLA-DRB1 par pays

L'analyse sur la base de l'allèle HLA-DRB1 a montré que l'Algérie, Tunisie et France s'observent dans le même groupe avec une similarité plus claire entre Algérie et Tunisie, les autres pays se positionnent séparément un peut plus loin, et La Chine se retrouve dans une position très loin de l'Algérie, ainsi que des autres populations.

### 2- Discussion :

Le polymorphisme du système HLA et mal étudié dans la population Algérienne saine pour plusieurs raisons, y compris: la limite de la taille des échantillons, la sensibilité de la technologie de typage HLA et le type du locus HLA étudié, cependant, quelques études sur la population générale ont été présentées tel que les travaux menés par Villena et al en **1995**, et Reviron et al., **1993**.

#### 2-1- Fréquences alléliques :

Les données obtenues ont montrés l'expression de certains allèles, dont les allèles HLA-A\*68, -C\*15 et -C\*16 qui ont été absentes dans l'étude réalisée sur un échantillon Algérien de 106 individus lors de l'étude menée par Villena et al en **1995**, ont été observés avec des fréquences presque élevées dans notre étude 7.38%, 8.41%, 8.41% respectivement.

Les résultats obtenus ont montrés la prévalence de l'allèle HLA-A\*02 en Algérie, comme pour toutes les populations à travers le monde.

Notre étude confirme l'absence de l'allèle HLA-A\*80. Bien que cet allèle soit rare, il est important de noter s'il existe dans notre population.

Le locus HLA-B montre une grande diversité dans notre population avec 26 allèles comme pour la population Tunisienne (Mahfoudh N et al., **2013**) et Marocaine (Brick et al., **2015**).

Une haute représentation de certains groupes d'allèles qui ont été partagés avec les Tunisiens (A30, B44, B35, B50, DR04, DR07, DR03) et les Marocains (A68, B44, B35, B50, DRB104, DRB115 et DRB1 13). (**Brick et al.**, 2015 ; **Mahfoudh N et al.**, 2013)

Les allèles HLA-B\*44, HLA-B\*35 et -B\*50 sont les plus fréquents chez la population Algérienne et sont également fréquents chez les Marocains et les Tunisiens, alors qu'il n'est pas le cas pour les populations lointaines (Chine et Brésil) (Chun-mei Shen et al., **2010** ; Luana de Cassia et al., **2014**).

Les allèles les plus fréquents pour le locus HLA-C (C\*07, C\*06 et C\*04) sont également fréquents chez les tunisiens (Mahfoudh N et al., **2013**) et les Marocains (Brick et al., **2015**) avec des fréquences presque similaires, ce qui confirme l'affinité existant entre les maghrébins.

Le locus HLA-DRB1 montre une grande similitude avec les populations Maghrébines, dont, les 3 populations (Algérie, Tunisie, Maroc) partagent les mêmes allèles plus fréquents (DRB1\*03 et DRB1\*04).

Cette étude est effectuée non seulement pour montrer l'expression de certains allèles HLA mais aussi pour confirmer la rareté d'autres allèles. En effet les allèles A\*74, B\*37, B\*39, C\*01, DQB1\*04 qui sont observées avec des fréquences base lors de l'étude menée par Villena et al en **1995**, et dans les travaux portés sur les populations utilisées pour l'étude comparative (Brick et al., 2015 ; Mahfoudh N et al., **2013** ; Rendine et al., **2012** ; Cesbron et al., **2015** ; Sanchez et al., **2003** ; Chun-mei Shen et al., **2010** ; Luana de Cassia et al., **2014**), sont également rares dans notre études.

HLA-B17, -B64, -B75, -B76, -B77 et -DRB1 17 sont absents dans notre étude ainsi que dans plusieurs études portées sur des populations différents : Tunisie (Mahfoudh N et al., **2013**), Maroc (Brick et al., **2015** ; Kabbaj et al., **2011**) Brésil (Luana de Cassia et al., **2014**), Italie (Rendine et al., **2014**), Basque (Sanchez et al., **2003**), France (Cesbron et al., **2015**), alors qu'ils sont présents dans une étude de la population chinoise (Chun-mei Shen et al., **2010**) réalisée sur un échantillon de 10.000 individus avec des fréquences de 0.01%, 0.12%, 3.94%, 0.11%, 0.06%, 3.87% respectivement, ceci est expliqué par l'importance d'effectuer l'étude sur un grand échantillon, donc plus la taille de l'effectif est grande, plus la chance d'apparition d'allèles rares est élevée.

D'autre part, L'allèle HLA-A\*02 le plus fréquent dans notre étude (21.67%), dans les études utilisé pour l'étude comparative, et chez toute les populations a travers le monde, est retrouvé en deuxième position chez les Basques (**Sanchez et al.**, 2003), ceci est expliqué probablement par l'inconvénient que présente l'étude sur un nombre réduit d'individus (83 individus chez ces derniers).

### **2-2- Relation génétique :**

#### **2-2-1- Relation avec les Maghrébins :**

Notre étude présente une relation extrêmement claire entre l'Algérie et les autres maghrébins du fait de la présence d'un nombre très élevé d'allèles comparables lors de la comparaison, duquel, la différence se limite à un ou deux allèles HLA seulement, sauf pour la comparaison des allèles HLA-B avec les Marocains, dont les résultats ont montrés une différence significative pour 5 allèles, cette différence est causé probablement par la position géographique que prend le Maroc, facilitant le passage des différentes civilisations.

Pour des raisons géographique et historique évidents, les résultats trouvés ont montrés que les maghrébins sont génétiquement liées et confirme les relations ethniques entre l'Algérie, Tunisie et Maroc.

#### **2-2-2-Relations génétiques avec les populations de l'Europe occidentale**

Les résultats confirment la présence d'une relation et un lien entre l'Algérie et les européens du fait de la présence d'un nombre considérable de fréquences comparables, donc notre étude confirme l'idée que l'Algérie et les pays de l'Europe occidentale sont proches non seulement géographiquement mais aussi génétiquement, ceci due au fait que les anciens maghrébins qui ont apparu en Afrique du Nord ont été mélangé avec un très grand nombre de populations à l'époque, tel que les Phéniciens, les Romains, les Français, Les Espagnols, Les Italiens..., ce qui influence sur les relations génétique actuelles entre les populations Maghrébines et celle de l'Europe occidentales. De plus, notre étude a confirmé l'effet du colonialisme et les flux migratoires entre l'Algérie et les pays Européens étudiés.

Sachant que la plupart des Algériens sont des descendants des anciens Berbères [38], Nous partons de l'hypothèse qu'au cours du temps, les différentes populations Européennes qui ont migré au nord de l'Afrique, ont très certainement laissé leurs empreintes dans le patrimoine génétique des populations berbères [14].

### **2-2-3- Relation avec les populations lointaines :**

A fin d'effectuer une comparaison avec des populations géographiquement éloignées de l'Algérie, la Chine et le Brésil ont été choisis pour l'étude comparative, et indéniablement, la Chine représente les plus fortes différences avec l'Algérie. L'existence d'une différence extrêmement élevée entre l'Algérie et la Chine avec différence significative pour presque tous les allèles HLA « $p=0.001$ » a une seule interprétation, c'est que les pays éloignés géographiquement peuvent être éloignés génétiquement, donc les deux populations sont non seulement différent dans leurs cultures, langage, attitudes... mais aussi dans leurs profil génétiques, ceci confirme que la distribution des différents allèles de classe I et II varie selon l'ethnie et l'origine géographique des populations et donc défend l'idée de se servir du système HLA comme marqueur d'une expression génétique identitaire.

### **2-3- Analyse en composante principale (ACP) :**

Les groupes proches sont ceux des pays présentant des similarités pour la distribution des allèles HLA. En tenant compte de la relation ethnique qui existent entre les populations du Maghreb, l'ACP a pu donner les résultats les plus pertinents, dans lesquels, Maroc et Tunisie se rapprochent le plus de l'Algérie, ceci confirme les relations génétique que présentent ces populations.

Cette analyse a pu, aussi, confirmer l'effet du colonialisme sur notre population, essentiellement France, qui se rapproche de l'Algérie et donc, présente un fond génétique commun avec notre population.

De plus, l'analyse a réussi de faire apparaitre La Chine très loin de notre pays. En tenant compte l'écart existant entre ces deux pays, la position que prend La chine semble être très logique, et montre que l'Algérie et La chine sont génétiquement très éloignés.

Généralement, les populations Maghrébines s'avèrent particulièrement intéressantes en étant comparées avec les autres populations méditerranéennes avec lesquelles elles partagent un fond génétique commun malgré des différences attendues suite aux métissages avec différentes populations.

### **2-4-HLA et greffe de moelle osseuse :**

L'apport de cellules, de tissus ou d'organes d'un individu à un autre non identique génétiquement conduit à un risque de rejet immunologique. En général, Le système HLA constitue un obstacle majeur au succès de ces transplantations.

Le greffe de moelle osseuse représente une alternative thérapeutique majeure dans le traitement d'hémopathie maligne, cependant, la compatibilité HLA parfaite entre donneurs et receveurs est indispensable pour cette transplantation. En effet, les données obtenues et l'estimation du profil immunogène en Algérie et d'autres pays maghrébines peuvent aider pour le développement et le maintien d'une base de données, qui servira de référence pour la recherche de donneurs compatibles.

### **2-5- Association HLA-Maladie :**

#### **2-5-1- Association HLA-Spondylarthrite ankylosante :**

L'allèle HLA-B\*27 qui est connu pour être associé à la spondylarthrite ankylosante, est retrouvé avec une fréquence base dans notre étude (2.18%) ainsi que pour tous les populations seines étudiés, citant par exemple le Maroc (1.7%), la Tunisie (1.22%), la Chine (1.85%), ainsi, la comparaison entre les populations a montré que les fréquences pour cet allèle sont comparables «  $0.13 < p < 0.78$  » même pour la Chine qui présente des différences hautement significatif avec l'Algérie pour presque tous ces allèles HLA.

#### **2-5-2- Association HLA- Maladie de Behçet :**

L'allèle HLA-B\*51 qui est connu pour être associé à la maladie de Behçet, est retrouvé avec une fréquence presque élevé chez la population Algérienne seine (7.52%), ainsi que pour les autres populations étudiées avec une fréquence qui varie entre 4.88% et 8.3%, ceci est expliqué par le fait que la manifestation de cette maladie est le résultat de l'expression d'un nombre considérable de gènes outre le HLA-B\*51.

### **2-5-3- Association HLA- Diabète type1 :**

Les allèles DRB1 \* 03 et DRB1 \* 04, qui sont connus pour être associée à la maladie du diabète type 1 (Masahito ., **2011**) sont très fréquents dans notre étude (19 et 16%, respectivement), comme pour les 2 autres pays maghrébins. Cette observation devait être prise en considération pour les futures études d'association HLA - maladies dans notre population.



# Conclusion

### **Conclusion :**

Ce travail constitue une base de données pour l'étude du polymorphisme du système HLA dans la population Algérienne. Un échantillon de 271 individus a pu montrer la fréquence des allèles HLA, leur distribution, ainsi que leur diversité au sein de notre population en marquant la présence, l'absence ou la haute représentation des allèles HLA.

Les données obtenus lors de la comparaison montrent les relations génétiques extrêmement claire entre l'Algérie, les Maghrébins et certain Européens et permet d'améliorer nos connaissances sur la composition génétique des populations et les relations ethnique existant, et ceci en utilisant le système HLA dans une perspective anthropologique en tant que marqueur d'expression génétique identitaire

En outre, les résultats trouvés constitue une base de données qui peut être utilisé comme référence pour la recherche de donneurs compatible pour la greffe de moelle osseuse en cas de situation non apparentées en constituant un fichier de donneurs , et l'utilisation de cette base de données pour les futurs études portant sur l'association HLA-Maladie en Algérie.

Ce modeste travail, nécessite également d'être suivi d'une étude sur les fréquences haplotypiques des antigènes HLA ainsi que leurs déséquilibres de liaison, et l'utilisation de cette base de données haplotypique pour la comparaison entre les populations du fait de l'existence de certain haplotypes qui caractérise des ethnies bien précise, tel que l'haplotype HLA-A1-B8 pour les Européennes. D'autre part, une étude pareille porté sur une population, doit être nécessairement effectuée sur un échantillon plus grand a fin d'assurer un bon rendement et augmenter l'efficacité des résultats. De plus, la détermination du profil immunogène des individus nécessite d'être prise en considération pour la constitution d'une base de référence pour la recherche de donneurs compatibles.

# Références bibliographiques

## Références Bibliographiques

---

- [1] Al youcef,A .(2006).Anticorps anti BP 180 et système HLA dans les pemphigoïdes auto-immunes. Thèse de doctorat, UNIVERSITE DE LIMOGES .98.
- [2] AMROUN, H. (2009). facteurs de predisposition génétique aux spondylarthropathies a Alger. These de doctorat en sciences medicales faculté de Medecine d'Alger.
- [3] Arnaiz-Villena,A., Benmamar,D., Alvarez,M., Diaz-Campos,N., Varela,P., Gomez Casado,E., Martinez-Laso,J .(1995). HLA Allele and Haplotype Frequencies in Algerians Relatedness to Spaniards and Basques. Human Immunology 43, 259-268 .
- [4] Boetsch, G., Gibert,M. (2011). HLA (système). Revues.org, 3474-3479.
- [5] Brick,C ., Atouf, O ., Bouayad,A ., Essakalli,M (2015). Moroccan study of HLA (-A, -B, -C, -DR, -DQ) polymorphism in 647 unrelated controls.
- [6] Cesbron Goutiér,A., Gagne,K., Retière,C., Devys,A., D.Bognon,J .(2015). Le système HLA. 13-000-M-53.
- [7] Chun-mei Shen ., Bo-feng Zhu ., Shi-hui Ye ., Meng-li Liu ., Guang Yang ., Sheng Liu ., Hai-xia Qin ., Hua-dong Zhang ., Rudolf Lucas ., Shen-bing Li .(2010). Allelic diversity and haplotype structure of HLA loci in the Chinese Han population living in the Guanzhong region of the Shaanxi province.Human Immunology 71 , 627–633.
- [8] Coudray, C., Torroni, A., Achilli, A., Pala, M., Olivieri, A., Larrouy, G., Dugoujon, J.M., 2009, Les lignées mitochondriales et l’histoire génétique des populations berbérophones du nord de l’Afrique. Antropo, 18, 63-72.
- [9] Eliaou, J.F.(2007). IMMUNITE ADAPTATIVE : STRUCTURE RECONNUES (CMH ET ANTIGÈNES). MMUNO/I5-CMH\_et\_AG\_v2.
- [10] Elsermans,V. (2013). Le système HLA. DES de Biologie médicale.

## Références Bibliographiques

---

- [11] Fadhlaoui-Zid, K., Sanchez-Mazas, A., Buhler, S., Khodjet Ell khill, H., Ben Amor, M., Comas, D., Dugoujon, J.M., Slama, H., Ben Ammar Elgaaeid, A.mel.(2009) Caractérisation génétique des isolats berbérophones du Sud tunisien par confrontation des résultats de trois marqueurs polymorphes. *Antropo*, 18, 73-86.
- [12] Forbes S.A., Trowsdale J. (1999). The MHC quarterly report. *Immunogenetics*.50: 152-159.
- [13] Guide des analyse en immunologie (2014).Elsevier Masson SAS. 229-236.
- [14] Hajjej,A. (2010). L'anthropologie génétique des populations méditerranéennes: Le système HLA et l'origine des méditerranéens. Editions Universitaires Europeennes. 136, France.
- [15] HMIDA,S., MOJAAT,N., ABID,S ., DRIDI ,A ., GENETET,B., BOUKEF,K., SEMANA,G. (1995). Etude du polymorphisme HLA de classe I dans la population tunisienne. *TCB*, 5:381-386.
- [16] Jean ., Marc,P (2011). Le complexe majeur d'histocompatibilité. Département Biologie, Pathologie et Sciences de l'aliment.
- [17] Kabbaj,M., Oudghiri,M., Naya,A., Naamane,H., Bennani,S. (2012). Polymorphism of human leukocyte antigen-A, -B, and-DRB1 in a Moroccan population from Casablanca: study of the allelic and the haplotypic frequencies. *Ann Biol Clin* 2011; 63 (3): 295-301.
- [18] Labalette,M., Bahram,S., Béné,M,C. Polymorphisme et présentation des antigènes aux lymphocytes T. [org/raisil/raisil/L02](http://org/raisil/raisil/L02), page82-4.
- [19] LEE-ROBIN, S . (2009). Détection de l'allèle HLA B\*5701 préalable a la détection prescription d'abacavir. Haute Autorité de santé. 6-42.

## Références Bibliographiques

---

- [20] Luana de Cassia,S., Fabiana Covolo de Souza.,S ., Elaine Valim Camarinha,M.(2014). Frequency of alleles and haplotypes of the human leukocyte antigen system in Bauru, São Paulo, Brazil.REV BRAS HEMATOL HEMOTER.36 (2):108-114
- [21] Mahfoudh,N., Ayadi,I  
., Kamoun,A., Ammar,R, Mallek,B, Maalej,L., Hakim,F., Gaddour,L., Rebai A., Makni,H (2013). Analysis of HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ polymorphisms in the South Tunisian population and a comparison with other populations . Ann Hum Biol, 40(1):41-7.
- [22] Masahito,K. (2011). Relationship of Type 1 Diabetes with Human Leukocyte Antigen (HLA) Class II Antigens Except for DR3 and DR4. ISBN 978-953-307-362-0.
- [23] Mazaz,A.S ., Pellegrini,B. (1990).Polymorphismes rhésus, GM et HLA et histoire de l'homme moderne. Bulletins et Mémoires de la Société d'anthropologie de Paris, Nouvelle Série, tome 2 fascicule 1, 1990. pp. 57- 75.
- [24] Moalic,V .(2008). Comment est réalisé un typage HLA ? Réanimation (2008) 17, 407-411.
- [25] Moalic,V .,Ferec,C.(2005) .Typage HLA, méthodes d'analyses et applications cliniques. Presse Med ; 34: 1101-8.
- [26] OTZ,J ., CHARRON,D ., GAUTREAU,C ., LOISEAU,P. (2013). Annales du contrôle national de qualité des analyses de biologie médicale. Ansm. 1-35.
- [27] Pommier,A (2012) .Rôle des lymphocytes T CD4+ régulateurs dans la suppression des réponses immunitaires anti-tumorales. Université Renne Descartes, 12-13.
- [28] Pr Hatem Masmoudi (2009).Système HLA Complexe majeur d'histocompatibilité de l'homme. Faculté de médecine de Sfax.

## Références Bibliographiques

---

- [29] Rendine ,S., Ferrero,N., Sacchi,N., Costa,C., Pollichieni,C., Amoroso,A .(2012). Estimation of human leukocyte antigen class I and class II high-resolution allele and haplotype frequencies in the Italian population and comparison with other European populations. *Human Immunology* 73 (2012) 399-404.
- [30] REVIRON,D., ANDRE M., CANTALOUBE J. F., BIAGINI P., CHICHEPORTICHE,C., MERCIER P. (1993). Polymorphisme HLA-DRB1 et HLA-DQB1 dans la population algérienne originaire d'Alger . 1993, vol. 36, n°6, pp. 509-516 .
- [31] Rihet,P. (2004). Glossaire. Biologie univ, p93.
- [32] Sanchez-Velasco,F., Gomez-Casado,E., Martinez-Laso,J., Moscoso,J., Zamora,J Lowy,E., Silvera,E., Cemborain,A., Leyva-Cobiàn,F., Arnaiz-VellinaA (2003). HLA alleles in isolated population from north spain: origine of the basque and the ancients Iberians. *Tissue antigens* 61: 384-392
- [33] SEYDOU GAOH, H. (2006). Variabilité génétique du système HLA après stimulation par des épitopes de VIH. Thèse de pharmacie. Université de Bamako,Mali.51P.
- [34] Teisserenc,M .(2012). Complexe Majeur d’Histocompatibilité. Uploads/1/3/9/0/13905422.
- [35] Tissier,M ., Asesio,N. (2011) .Gènes et molécules du Complexe Majeur d’Histocompatibilité. Master d’immunologie.

### **Sites internet :**

- [36] [anne.decoستر.free.fr/immuno/soigs/soigs.htm](http://anne.decoستر.free.fr/immuno/soigs/soigs.htm).(Le soi et le non soi).
- [37] [campus.cerimes.fr/gynecologie-et-obstetrique/.../item31/.../glossaire.html](http://campus.cerimes.fr/gynecologie-et-obstetrique/.../item31/.../glossaire.html)

## Références Bibliographiques

---

[38] Origin, Diffusion, and Differentiation of Y-Chromosome Haplogroups E and J (Algeria). Consulter en 2014.

[39] SGE HLA Nomenclature @ hla.alleles.org (Nomenclature for Factors of the HLA System). Consulter en juin 2015.

[40] ua.unige.ch/agp (Laboratoire d'anthropologie, génétique et peuplements « AGP »). Consulter en 2015.

[41] www.biofortuna.com (Mode d'emploi des kits de typage HLA Biofortuna SSPGo) consulté en janvier 2014.

[42] www.allenex.com/en/transplantation/olerup-ssp/.(Olerup SSP). Consulter en 2015.

[43] www.futura-sciences.com/magazines/sante/infos/dico/d/genetique-cmh-118.

[44] www.futura-sciences.com/magazines/sante/infos/dico/d/genetique-exon-146.

[45] www.futura-sciences.com/magazines/sante/infos/dico/d/genetique-genome-154.

[46] www.futura-sciences.com/magazines/sante/infos/dico/d/medecine-greffe-2705.

[47] www.futura-sciences.com/magazines/.../genetique-taq-polymerase-263

[48] www.cancer.ca/fr-ca/.../human-leukocyte-antigen-hla-typing. (Typage des antigènes d'histocompatibilité -typage HLA-). Consulter en 2015.



# Annexes

## Annexe I:

## Mode opératoire de l'extraction d'ADN par Salting out Préparation du SLR

SLR 20X

NH <sub>4</sub> Cl.....	41,45g	} qsp: 250 ml
KHC0 <sub>3</sub> .....	5g	
EDTA.....	10ml	
(0.5M) PH= 7,4		

SLR 1X:

SLR 20X .....	25ml
H <sub>2</sub> O qsp.....	500 ml

## Préparation du SLB

Tris- HCL 2M.....	1.25ml
NaCl 3M.....	33.33 ml
EDTA 0,5 M, PH=8.2.....	1 ml
H <sub>2</sub> OD qsp.....	250ml

Mettre les solutions sous agitation magnétique ;

Transférer dans un flacon, étiqueter, dater, autoclaver et conserver à +4.

## Tris-HCl 2M :

Tris.....	60.55g
H <sub>2</sub> O qsp.....	250ml

Mettre l'EDTA avec 125ml d'H<sub>2</sub>O sous agitation magnétique jusqu'à dissolution complète.

Ajuster le PH à 7.4 avec du HCl (sous agitation)

Compléter le volume d'H<sub>2</sub>O à 250ml.

## EDTA 0.5 M :

EDTA.....	46.53g
H <sub>2</sub> O D.....	250 ml

Dans une fiole jaugée stérile, mettre l'EDTA avec 125 ml d'H<sub>2</sub>O D sous agitation magnétique jusqu'à dissolution complète.

➡ Ajuster le pH à 8.2 avec du NaOH 10N (sous agitation).

➡ Ajuster le pH à 7.4 avec du NaCl (sous agitation).

Compléter le volume d'H<sub>2</sub>O à 250 ml et transférer la solution dans un flacon stérile.

## NaCl 3M :

NaCl.....	46.53 g
H <sub>2</sub> O D qsp .....	250 ml

## NaCl 6M :

NaCl .....	87.66 g
H <sub>2</sub> O D qsp.....	250 ml

Mettre les solutions sous agitation magnétique jusqu'à dissolution complète.

La solution NaCl 6M est saturée, de ce fait un dépôt de sels restera au fond du flacon.

**Préparation du tampon**

{	<b>d'élution</b>	Tris 1M
	pH = 8 .....	10 ml
	EDTA 0,5 M pH = 8.....	2ml
	H <sub>2</sub> O d .....	1000 ml

**Lyse des GR :**

- 1- Prélever 10ml de sang dans un tube avec anti-coagulant EDTA.
- 2- Transférer le sang dans un tube flacon de 50 ml.
- 3 - Compléter à 45 ml avec la solution SLR ; Agiter vigoureusement et incubé dans la glace pendant 30 min.
- 4- Centrifuger 10 min / 2500 TPM / +4°C et éliminer le surnageant.
- 5- Répéter cette dernière étape (sans incubé dans la glace) jusqu'à l'obtention d'un culot blanchâtre. (Conservation du culot des GB à -20°C).

**Lyse des GB :**

- 6- Resuspendre le culot constitué de globule blancs dans :

{	3 ml de SLB ( bien mélanger)
	60 µl de PK (10 mg/ml)
	300 µl de SDS 100% Vortexer

Incuber à 37°C , over night

**Extraction par Nacl :**

- 7- Ajouter 1 ml de Nacl 6M et bien vortexer (avoir une mousse blanchâtre)
- 8- Centrifuger 15 min / 3600 TPM / +4°C

**Précipitation à l'éthanol :**

- 9- Transférer le surnageant dans un tube de 50 ml (=5ml)
- 10- Ajouter 2 volumes d'Ethanol 100% et mélanger doucement par retournement jusqu'à apparition de la méduse d'ADN .
- 11- Récupérer la méduse avec une pipette Pasteur
- 12- Laver la méduse avec 250µl d'Ethanol 70% puis éliminer l'Ethanol.
- 13- Laisser sécher la méduse à température ambiante 24h.
- 14-Resuspendre la méduse dans 250 µl d'eau distillée. (TE).

## Annexes N° II:

### Mode opératoire de l'électrophorèse de l'ADN amplifié sur gel d'agarose

#### Electrophorèse de l'ADN amplifié sur gel d'agarose :

##### Préparation de la solution EDTA 0.5 M :

- Peser 3.722 g d'EDTA.
- Ajouter 20 ml d'eau distillé.
- Vérifier que le PH=8.
- Remarque : pour préparer 40 ml de solution EDTA, peser 7.44 g.

##### Préparation du tampon TBE (5x) :

- Peser 54 g de Tris.
- Peser 27.5 g d'acide borique.
- Ajouter 20 ml de la solution EDTA (0.5 M, PH =8).
- Complétez avec l'eau distillé jusqu'à 1 litre.

##### Dilution de la solution de TBE avant l'utilisation :

Le tampon TBE doit être 0.5 X concentré (préparation du gel ou migration électrophorétique).

Pour un tapon TBE 5X concentré, effectuer une dilution au 1/10<sup>eme</sup> (100 ml de solution TBE pour 900 ml d'eau distillées).

Pour un tampon TBE 10X concentré, effectuer une dilution au 1/20<sup>eme</sup> (50ml de solution TBE pour 900ml d'eau distillés).

Vérifier le PH= 8

##### Préparation du gel d'agarose :

- 1- Préparer un gel d'agarose à 15% (3g d'agarose pour 200 ml de tampon Tris Borate EDTA dilué et préalablement préparé.
- 2- Faire fondre au micro-onde pendant 5 min.
- 3- Allumer la hôte.
- 4- Ajouter une goutte 5µl de BET (Bromure d'Ethéduim) au gel liquide.
- 5- Mélanger doucement.

- 6- Couler lentement le gel sur 2 à 3 cm d'épaisseur dans le support du gel
- 7- Positionner les 6 peignes
- 8- Laisser le gel se solidifier pendant 15 minutes.
- 9- Enlever les peignes une a une.
- 10-Enlever le plateau de gel délicatement.

### **Le dépôt de l'ADN amplifié:**

- 1- Remplir la cuve à électrophorèse avec le tampon Tris Borate EDTA.
- 2- Placer le support et le gel dans la cuve à électrophorèse.
- 3- Déposer 10  $\mu$ l d'ADN amplifié dans chaque puits avec la pipette.
- 4- Fermer la cuve, brancher les fils au générateur et mettre sous tension 150volte pendant 20 min.

Annexe III

Les solutions d'amorces spécifiques d'allèles, pré-aliquotées et lyophilisées  
aux parois des tubes PCR, kit de typage

1 1070bp negative Kontrolle/ negative control	2 140bp A1,36 A*01:01/02/03 (A1) A*36:01 (A36)	3 130bp A2 A*02:01/02/04-07/ 08/11-14/16/17/ 20/22/44 (A2) A*02:03 (A203) A*02:10 (A210)	4 300bp A3 A*03:01/02 (A3)	5 340bp A11 A*11:01/02.03 (A11)	6 320bp A23 (9) A*23:01 (A23)	7 350bp A24 (9) A*24:02/04-08/14/17 (A24) A*24:03/10 (A2403)	8 580bp A10.1 A*25:01 (A25) A*26:01-03/05/08 (A26) A*66:01 (A66)
9 190bp A25 (10) A*25:01 (A25) A*32:01/04 (A32)	10 300bp A26 (10),43 A*26:01-03/08 (A26) A*43:01 (A43) A*68:05 (A68)	11 170bp A34 (10) A*34:01/02 (A34)	12 170bp A6602,6603 A*66:02 (A66) A*66:03 (A10)	13 220bp A10.2 A*11:01/02/03 (A11) A*34:01/02 (A34) A*66:01/02 (A66) A*68:01/02 (A68) A*69:01 (A69)	14 90bp A36 A*36:01 (A36)	15 200bp A43 A*43:01 (A43)	16 190bp A68 (28) A*68:01-03/05 (A68)
17 380bp A69 (28) A*69:01 (A69)	18 130bp A29,31,32,33,74 A*29:01/02 (A29) A*31:01/02 (A31) A*32:01 (A32) A*33:01/03 (A33) A*74:01/03 (A74)	19 200bp A29 (19) A*29:01/02 (A29)	20 90bp A30 (19) A*30:01/02/04 (A30)	21 80,200bp A31 (19) A*31:01/02 (A31)	22 260bp A32 (19) A*32:01 (A32)	23 200bp A33 (19) A*33:01/03 (A33)	24 160bp A74 (19) A*74:01/03 (A74)
25 230bp A80 A*80:01 (A80)	26 240bp B7,703 B*07:02-07/09 (B7703)	27 220bp B8 B*08:01/04 (B8)	28 480bp B13 B*13:01/02 (B13)	29 260bp B64 (14),65 (14) B*14:01 (B64) B*14:02 (B65) B*14:03 (B14)	30 190bp B65 (14) B*14:02 (B65) B*14:03 (B14)	31 240bp B*15 without B75 B*15:01/04-07/24/ 25/27/30/35/39/ 40/45 (B62) B*15:03 (B72) B*15:12 (B76) B*15:16/17 (B63) B*15:47 (B70) B*46:01 (B46)	32 210bp B*15 without B63 B*15:01-13/15/18/ 21/23-25/27/29/ 30/31/35/37/39/ 40/45/47 (B62/70/71/72/ 75/76/77)
33 340bp B*15 without B75 B*15:02/21/31 (B75) B*15:03 (B72) B*15:05/06/25/39/ 40 (B62) B*15:09/23/29/37 (B70) B*15:10/18 (B71) B*15:13 (B77) B*15:16/17 (B63)	34 390bp B63 (15) B*15:16/17 (B63)	35 360bp B70,71 (70),72 (70),15 B*15:03 (B72) B*15:09/47 (B70) B*15:10/18 (B71) B*15:23/37 (B70) B*15:29 (B15)	36 20,450bp B62,63,75,77 (B75) B*15:02/11/21/31 (B75) B*15:03/25 (B62) B*15:13 (B77) B*15:17 (B63)	37 230bp B75,15 B*15:08 (B75) B*15:29 (B70)	38 280,300bp B76 B*15:12 (B76)	39 280bp B18 B*18:01-03 (B18)	40 140bp B27,2708 B*27:01/02/04-08/12 (B27/2708-) B*42:02 (B42) B*73:01 (B73)
41 310bp B7,8,14,35,39,42,... B*07:02-07/09 (B7703) B*08:01/04 (B8) B*14:01/02/03 (B64/65/14) B*35:01-06/08/10- 12/14/16/17/20/ 21/23/43 (B35) B*39:01-03/05/06/ 08-11 (B3901/3902/39-) B*42:01/02 (B42) B*48:01/02/03 (B48) B*67:01 (B67) B*78:01 (B78) B*81:01 (B81)	42 290bp B8,35,51,53,78 B*35:01-06/08/10- 12/14/16/17/21/ 23/43 (B35) B*51:01/02/05/06/ 08/09 (B51/5102) B*53:01 (B53) B*78:01 (B78)	43 130bp B18,35,78 B*18:01-03 (B18) B*35:01-06/08/10- 12/14/16/17/20/ 21/23/43 (B35) B*78:01 (B78)	44 200bp B37 B*37:01 (B37)	45 110bp B38 (16) B*38:01/02 (B38)	46 490bp B38 (16),39 (16),67 B*38:01/02 (B38) B*39:01 (B3901) B*39:02 (B3902) B*39:03/05/06/08- 10 (B39) B*39:11 B*67:01 (B67)	47 130bp B60 (40),48,81 B*40:01/07/10/12 (B60) B*48:01/03 (B48) B*81:01 (B81)	48 290bp B61 (40),47 B*40:02-04/06/08/11 (B61) B*40:05 (B4005) B*47:01 (B47)



49 690bp B8.11.42 B*08:01/04 (B8) B*41:01/02/03 (B41) B*42:01/02 (B42)	50 250bp B44 (12) B*44:02-06/10 (B44)	51 250bp B45 (12) B*45:01 (B45) B*50:02 (B45)	52 200bp B46 B*46:01 (B46)	53 230bp B47 B*47:01 (B47)	54 430bp B48 B*48:02 (B48)	55 140bp B49 (21) B*49:01 (B49)	56 210bp B49.50.51.52.55... B*15:04/16 (B62/63) B*49:01 (B49) B*50:01/02 (B50/45) B*51:01/02/07 (B51/5102) B*52:01 (B52) B*55:01 (B55) B*78:01 (B78)
57 140bp B40.41.45.47.50... B*40:01-08/10/11 (B4005/60/61) B*41:01/02/03 (B41) B*45:01 (B45) B*50:01/02 (B50/45)	58 120bp B51.5102/03.52 B*51:01/05/07/08/09 (B51) B*51:02 (B5102) B*52:01 (B52) B*78:01 (B78)	59 180bp B51.5102/03.52.53... B*15:13/17/24 (B77/63/62) B*44:06 (B44) B*51:01/02/05-09 (B51/5102) B*52:01 (B52) B*53:01 (B53) B*57:01-04 (B57) B*58:01/02 (B58)	60 100bp B52 B*35:10/16 (B35) B*37:01 (B37) B*52:01 (B52)	61 90bp B52.1 B*13:01/02 (B13) B*15:01/04-07/12/24/25/27/30/35/39/40/45 (B62/76)	62 330bp B8.38.51.52.53.58 B*38:01(B38) B*51:01/05-09 (B51) B*51:02 (B5102) B*52:01 (B52) B*53:01 (B53) B*58:01/02 (B58)	63 180bp B15.35.46.53.57.58 B*15:01-08/11-13/15/16/18/21/23-25/27/29/31/35/39 (B62/63/70/71/72/75/76/77) B*35:01/05/08/10/11/14/16/17/20/21/23/43 (B35) B*46:01 (B46) B*48:02 (B48) B*53:01 (B53) B*56:03 (B56) B*57:01 (B57) B*58:01/02 (B58) C*03:02	64 320bp B7.27.42.46.54.55... B*07:02/04-07/09 (B7) B*27:01/02/04-08 (B27/2708) B*42:01/02 (B42) B*46:01 (B46) B*54:01 (B54) B*55:01/02/04 (B55) B*56:01-04 (B56) B*67:01 (B67) B*73:01 (B73) B*81:01 (B81) B*82:01
65 210bp B54 (22) B*54:01 (B54)	66 110bp B7.42.55.56 (22).67 B*07:02/04-07/09 (B7) B*42:01/02 (B42) B*55:01/02/04 (B55) B*56:01-04 (B56) B*67:01 (B67) B*81:01 (B81) B*82:01	67 240bp B54.55.59.41.59 B*39:06 (B39) B*41:01 (B41) B*54:01 (B54) B*55:01/02 (B55) B*59:01 (B59)	68 340bp B56 (22) B*56:01-04 (B56)	69 310bp B57 (17) B*57:01-04 (B57)	70 280bp B58 (17) B*58:01/02 (B58)	71 280bp B13.59 B*13:01/02 (B13) B*59:01 (B59)	72 330bp B73 B*73:01 (B73)
73 400bp B62 (15).70.78 B*15:09 (B70) B*78:01 (B78)	74 240bp B*82 B*44:10 (B44) B*82:01	75 350bp Bw4 Bw4	76 350bp Bw6 Bw6	77 340bp Cw1 C*01:02/03 (Cw1)	78 210bp Cw2 C*02:02/03 (Cw2)	79 260bp Cw3 C*03:02/04/05/09 (Cw10) C*03:03 (Cw9) C*03:05/07/10 (Cw3)	80 290bp Cw9 C*03:03 (Cw9)
81 240bp Cw4 C*04:01/03-07 (Cw4)	82 380bp Cw5 C*05:01/05/09 (Cw5)	83 150bp Cw6 C*06:02-04 (Cw6)	84 110bp Cw6.1 C*06:02-04 (Cw6) C*07:04 (Cw7) C*18:01/02	85 290bp Cw7 C*07:01-06/08-10 (Cw7) C*07:07	86 160bp Cw8 C*08:01-04 (Cw8)	87 150bp Cw12 C*12:02/03	88 620bp Cw6.12 C*06:02-04 (Cw6) C*12:02-04
89 190bp Cw14 C*14:02/03/05	90 330bp Cw15 C*15:02-05/09	91 200bp Cw16 C*16:01/02/04	92 260bp Cw17 C*17:01/03	93 370bp Cw18 C*07:07/09 (Cw7/-) C*18:01/02			





1 1070bp negative Kontrolle/ negative control	2 140bp A1.36 A*01:01/02/03 (A1) A*36:01 (A36) <i>5ms byt low Adèle (5np added)</i>	3 130bp A2 A*02:01/02/04-07/ 09/11-14/16/17/ 20/22/44 (A2) A*02:03 (A203) A*02:10 (A210)	4 300bp A3 A*03:01/02 (A3)	5 340bp A11 A*11:01/02/03 (A11)	6 320bp A23 (9) A*23:01 (A23)	7 350bp A24 (9) A*24:02/04-08/14/17 (A24) A*24:03/10 (A2403)	8 580bp A10.1 A*25:01 (A25) A*26:01-03/05/08 (A26) A*66:01 (A66)
9 190bp A25 (10) A*25:01 (A25) A*32:01/04 (A32)	10 300bp A26 (10),43 A*26:01-03/08 (A26) A*43:01 (A43) A*68:05 (A68)	11 170bp A34 (10) A*34:01/02 (A34)	12 170bp A6602.6603 A*66:02 (A66) A*66:03 (A10)	13 220bp A10.2 A*11:01/02/03 (A11) A*34:01/02 (A34) A*66:01/02 (A66) A*68:01/02 (A68) A*69:01 (A69)	14 90bp A36 A*36:01 (A36)	15 200bp A43 A*43:01 (A43)	16 190bp A68 (28) A*68:01-03/05 (A68)
17 380bp A69 (28) A*69:01 (A69)	18 130bp A29.31,32,33,74 A*29:01/02 (A29) A*31:01/02 (A31) A*32:01 (A32) A*33:01/03 (A33) A*74:01/03 (A74)	19 200bp A29 (19) A*29:01/02 (A29)	20 90bp A30 (19) A*30:01/02/04 (A30)	21 180,200bp A31 (19) A*31:01/02 (A31)	22 260bp A32 (19) A*32:01 (A32)	23 200bp A33 (19) A*33:01/03 (A33)	24 160bp A74 (19) A*74:01/03 (A74)
25 230bp A80 (15) A*80:01 (A80)	26 240bp B7.703 B*07:02-07/09 (B7/703)	27 220bp B8 B*08:01/04 (B8)	28 480bp B13 B*13:01/02 (B13)	29 260bp B64 (14),65 (14) B*14:01 (B64) B*14:02 (B65) B*14:03 (B14)	30 190bp B65 (14) B*14:02 (B65) B*14:03 (B14)	31 240bp B*15 without B75 B*15:01/04-07/21/ 25/27/30/35/39/ 40/45 (B62) B*15:03 (B72) B*15:12 (B76) B*15:16/17 (B63) B*15:47 (B70) B*46:01 (B46)	32 210bp B*15 without B63 B*15:01-13/15/17/ 21/23-25/27/29/ 30/31/35/37/39/ 40/45/47 (B62/70/71/72/ 75/76/77)
33 390bp B3 (15) B*15:16/17 (B63)	34 360bp B70,71 (70),72 (70),15 B*15:03 (B72) B*15:09/47 (B70) B*15:10/18 (B71) B*15:23/37 (B70) B*15:29 (B15)	35 220,450bp B62,63,75,77 B*15:02/11/21/31 (B75) B*15:06/25 (B62) B*15:13 (B77) B*15:17 (B63)	36 230bp B75,15 B*15:08 (B75) B*15:29 (B70)	37 280,300bp B76 B*15:12 (B76)	38 280bp B18 B*18:01/03 (B18)	39 140bp B27,2708 B*27:01/02/04-08/12 (B27/2708/-) B*42:02 (B42) B*73:01 (B73)	40 310bp B7,8,14,35,39,42... B*07:02-07/09 (B7/703) B*08:01/04 (B8) B*14:01/02/03 (B64/65/14) B*35:01-06/08/10- 12/14/16/17/20/ 21/23/43 (B35) B*39:01-03/05/06/ 08-11 (B3901/3902/39/-) B*42:01/02 (B42) B*48:01/02/03 (B48) B*67:01 (B67) B*78:01 (B78) B*81:01 (B81)
41 290bp B3,35,51,53,78 B*08:01 (B8) B*18:01-06/08/10- 12/14/16/17/21/ 23/43 (B35) B*15:01/02/05/06/ 08/09 (B51/5102) B*39:01 (B53) B*78:01 (B78)	42 130bp B18,35,78 B*18:01-03 (B18) B*35:01-06/08/10- 12/14/16/17/20/ 21/23/43 (B35) B*78:01 (B78)	43 200bp B37 B*37:01 (B37)	44 110bp B38 (16) B*38:01/02 (B38)	45 490bp B38 (16),39 (16),67 B*38:01/02 (B38) B*39:01 (B3901) B*39:02 (B3902) B*39:03/05/06/08- 10 (B39) B*39:11 B*67:01 (B67)	46 130bp B60 (40),48,81 B*40:01/07/10/12 (B60) B*48:01/03 (B48) B*81:01 (B81)	47 290bp B61 (40),47 B*40:02-04/06/08/11 (B61) B*40:05 (B4005) B*47:01 (B47)	48 690bp B8,41,42 B*08:01/04 (B8) B*41:01/02/03 (B41) B*42:01/02 (B42)





49 250bp B44 (12) B*44:02-06/10 (B44)	50 250bp B45 (12) B*45:01 (B45) B*50:02 (B45)	51 200bp E46 B*46:01 (B46)	52 230bp B47 B*47:01 (B47)	53 140bp B49 (71) B*49:01 (B49)	54 210bp B49,50,51,52,55... B*15:04/16 (B52/63) B*49:01 (B49) B*50:01/02 (B50/45) B*51:01/02/07 (B51/5102) B*52:01 (B52) B*55:01 (B55) B*78:01 (B78)	55 140bp B40,41,45,47,50... B*40:01-08/10/11 (B4005/60/61) B*41:01/02/03 (B41) B*45:01 (B45) B*50:01/02 (B50/45)	56 120bp B51,5102/03,52... (B51) B*51:01/05/07/08/09 (B51) B*51:02 (B5102) B*52:01 (B52) B*78:01 (B78)
57 130bp B51,5102/53,52,53... (B52) B*15:13/17/24 (B77/63/62) B*44:06 (B44) B*51:01/02/05-09 (B51/5102) B*52:01 (B52) B*53:01 (B53) B*57:01-04 (B57) B*58:01/02 (B58)  B*13 weakly coamplified	58 100bp B52 B*35:10/16 (B33) B*37:01 (B37) B*52:01 (B52)	59 90bp B52.1 B*13:01/02 (B13) B*15:01/04-07/12/24/25/27/30/35/39/40/45 (B62/76)  B*46 weakly coamplified	60 330bp B8,38,51,52,53,58 B*38:01 (B38) B*51:01/05-09 (B51) B*51:02 (B5102) B*52:01 (B52) B*53:01 (B53) B*58:01/02 (B58)	61 320bp B7,27,42,46,54,55... (B7) B*07:02/04-07/09 (B7) B*27:01/02/04-08 (B27/2708) B*42:01/02 (B42) B*46:01 (B46) B*54:01 (B54) B*55:01/02/04 (B55) B*56:01-04 (B56) B*67:01 (B67) B*73:01 (B73) B*81:01 (B81) B*82:01	62 210bp B54 (22) B*54:01 (B54)	63 110bp B7,42,55,56 (22),67 (B7) B*07:02/04-07/09 (B7) B*42:01/02 (B42) B*55:01/02/04 (B55) B*56:01-04 (B56) B*67:01 (B67) B*81:01 (B81) B*82:01	64 240bp B54,55,39,41,59 B*39:06 (B39) B*41:01 (B41) B*54:01 (B54) B*55:01/02 (B55) B*59:01 (B59)
65 340bp E56 (22) B*56:01-04 (B56)	66 310bp B57 (17) B*57:01-04 (B57)	67 280bp B58 (17) B*58:01/02 (B58)	68 280bp B13,59 B*13:01/02 (B13) B*59:01 (B59)	69 330bp E73 B*73:01 (B73)	70 400bp B62 (15),70,78 B*15:09 (B70) B*78:01 (B78)	71 240bp B*82 B*44:10 (B44) B*82:01	72 350bp Bw4 Bw4
73 350bp Bw6 Ew6	74 200bp DR1 DRB1*01:01/02 (DR1)	75 200bp DR103 DRB1*01:03 (DR103)	76 200,210bp DR15 DRB1*15:01-03 (DR15)	77 260bp DR16 DRB1*16:01/02 (DR16)	78 220bp DR17 DRB1*03:01 (DR17) DRB1*03:02 (DR18)	79 240bp DR18+ DRB1*03:02 (DR18) DRB1*13:01-04/06/08/10/12 (DR13) DRB1*14:03 (DR1403)	80 210bp DR21 DRB1*04:01-11 (DR4)
81 260bp DR7 DRB1*07:01 (DR7)	82 210,250bp DR8 DRB1*08:01-04/06/10/11 (DR8)	83 220bp DR9 DRB1*09:01 (DR9)	84 270bp DR10 DRB1*10:01 (DR10)	85 270bp DR11 DRB1*11:01-04/06/11 (DR11)	86 180bp DR12 DRB1*12:01/02 (DR12)	87 200bp DR13.1 DRB1*11:02 (DR11) DRB1*13:01-04/06/08/10/12 (DR13)	88 200,210bp DR13.3 DRB1*08:01/02/04/06/11 (DR8) DRB1*11:01-04/06/11 (DR11) DRB1*12:02 (DR12) DRB1*13:01/02/04/05/08 (DR13)
89 180bp DR13.4 DRB1*03:01/02 (DR17/18) DRB1*13:01-06/08/10/12 (DR13) DRB1*14:02/03/05/06 (DR14/1403)	90 200,210bp DR14.1 DRB1*14:01/04/05/07 (DR14/1404)	91 150bp DR14.2 DRB1*13:10 (DR13) DRB1*14:02/06 (DR14)	92 150,220bp DR14.3 DRB1*14:03 (DR1403)	93 180bp DR14.4 DRB1*14:01/07 (DR14)	94 240bp DR52 DRB3*01:01/02 DRB3*02:01-03 DRB3*03:01 (DR52)	95 170bp DR53 DRB4*01:01/03 (DR53)	96 260bp DR51 DRB5*01:01/02/08N DRB5*02:02 (DR51)



## Kit de typage ABDR SSP (Suite)

## DQB SSP Kit

Auswerteschema/Worksheet

REF

LOT



826220

B343201-db2013-04V1

2015-07-22

167872/04-03/2013

Name/ Name		Vorname/ First name		Geburtsdatum/ Date of birth	
DNA-Nr./ DNA-No.		Herkunft/ Origin		Diagnose/ Diagnosis	
Taq-Pol. Lot.No.		Datum/ Date		Untersucher/ Signature	
Ergebnis/ Result	<b>DQB1*</b>	Bemerkungen/ Comments			

1/H 220bp	2/G 220bp	3/F 210bp	4/E 130bp	5/D 130bp	6/C 130bp	7/B 120bp	8/A 160bp
DQB1*05(DQ5)	DQB1*06(DQ6)	DQB1*02(DQ2)	DQB1*02(DQ2) DQB1*03(DQ8)	DQB1*03(DQ7)	DQB1*03(DQ8/ DQ9)	DQB1*03(DQ7/ DQ9)	DQB1*04(DQ4)

## Kit de typage DQ SSP

## Annexes N° IV:

## Association HLA-maladies

**Tableau** : Principales association Human Leucocyte Antigen (HLA) et maladies (d'après J.Hors. In : HLA, complexe majeur d'histocompatibilité de l'homme. J.Dausset et M. Pla eds. Médecine Sciences Flammarion, 1989).

HLA	Maladie
A1	Maladie de Hodgkin
A2	Sarcome Déficit en IgA
A3	Hémochromatose Idiopathique
B51	Maladie de Behçet
B27	Spondylarthrite ankylosante
B46	Cancer du nasopharynx
Cw6	Psoriasis
DR3	Lupus érythémateux disséminé Maladie de Besdew Myasthénie
DR3+DR4	Diabète insulino-dépendante
DR3+DR7	Maladie coéliquaue
DR4	Polyarthrite rhumatoïde Qu' est que Pemphigus
DR5	Sarcome de Kapusi
DR7	Cancer de la thyroïde
DR8	Arthrite juvénile
DQ3	Leucémie HTLV1 ( <i>human T-cell lymphoma virus</i> )