

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLEB - BLIDA 1 -

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

MEMOIRE DE PROJET DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME
DE MASTER EN SNV

Option : Génétique - Physiologie

THEME

**Etude des gènes HLA chez les couples Donneurs/Receveurs
candidats à la greffe rénale au niveau du CHU de Blida**

Présenté par :

Mlle Ben Ali khodja Fatima Zohra

Mlle Zedmia Zineb

Devant le jury :

Présidente : Mme ROUAKI.F	MCB	USDB
Examinatrice : Mme ZERROUTI	MAA	USDB
Promoteur : Dr M.L ZELTNI	Assistant en Immunologie	CHU de Blida
Co-promotrice : Mme GUESSAIBIA.N	MCB	USDB

Promotion 2015 - 2016

Sommaire

Dédicaces	
Remerciements	
Résumé	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction.....	01
Chapitre I : synthèse bibliographique	
I.1 Insuffisance rénale.....	03
I.2 Epidémiologie.....	03
I.3 Définition et classification de la maladie rénale chronique	04
I.4 Etiologie de l'insuffisance rénale chronique.....	05
I.5 Traitements de l'insuffisance rénale chronique terminal.....	06
I.5.1 Dialyse	06
I.5.2 La transplantation	07
I.5.2.1 Le bilan biologique en pré-transplantation	07
I.6. Types de rejet en transplantation	08
I.6.1 Le rejet hyper aigu	08
I.6.2 Le rejet aigu.....	09
I.6.3 Le rejet chronique	10
I.7 Le système de HLA.....	10
I.7.1 Localisation des gènes HLA	11
I.7.2 Caractéristique des gènes HLA	12
I.7.3 Nomenclature	16
I.7.4 Structure biochimique des molécules et gènes HLA	17
I.7.4.1 Les molécules HLA de Classe I	17
I.7.4.2 Les molécules HLA de Classe II	18
I.7.5 L'étude du Polymorphisme des gènes HLA.....	19
I.7.5.1 Technique Sérologique	19
I.7.5.2 Typage par Biologie Moléculaire	20

I.7.6	Expression des molécules HLA	20
I.7.7	Fonction des molécules HLA.....	21
I.7.7.1	Rôle des molécules HLA dans la présentation des antigènes.....	21
I.7.7.2	Rôle dans la maturation des lymphocytes T.....	21
I.7.7.3	Régulation de la cytotoxicité des NK	22
I.7.8	Implication clinique du système HLA	22
I.7.8.1	HLA et transplantation d'organes	22
I.7.8.2	HLA et maladies	22
Chapitre II : Matériel et méthodes		
II.1	Matériel	23
II.1.1	Patients	23
II.1.2	Les réactifs utilisés.....	23
II.2	Méthodes.....	24
II.2.1	Biologie moléculaire.....	24
II.2.1.1	Extraction de l'ADN génomique	24
II.2.2	PCR	25
II.2.2.1	Définition	26
II.2.2.2	Le principe	26
II.2.2.3	PCR-SSP	28
II.2.2.4	Mode opératoire	30
II.2.3	Etude statistique.....	32
Chapitre III : Résultats et Discussion		
III.1	Résultats	33
III.1.1	Etude Cas/Témoin	33
III.1.1.1	Caractéristique phénotypiques de la population étudiée	33
III.1.1.2	Comparaison entre Allèle HLA de classe I et II des patients avec ceux des témoins	33
III.1.2	Etude Fréquence Alléliques HLA.....	37
III.1.2.1	Les caractéristiques phénotypiques de la population étudiée.....	37
III.1.3	Etude des Fréquence haplotypique	42
III.2	Discussion.....	44
III.2.1	Etude cas/témoins	44

III.2.2 Etude des fréquences alléliques	44
III.2.3 Etude des fréquences Haplotypiques.....	46
Conclusion	48
Références Bibliographique	
Annexe	

Dédicace de Ben Ali Khodja Fatima Zohra

El hamdoulillah de m'avoir accordé la force et de m'avoir guidé tout au long de la réalisation de ce travail, j'espère que ce travail sera une cause pour avoir votre satisfaction.

A mes chères parents : à ma mère, la femme qui m'a donné la vie et qui n'a épargné aucun effort pour me satisfaire, à mon père qui m'a encouragé durant la réalisation de ce travail, que Dieu vous garde toujours à mes côtés.

A mes chères grandes sœurs Assia et Meriem, pour m'avoir soutenue dans mon travail et avoir toujours été présentes dans les moments difficiles.

A mes chères petits frères Mohammed et Khaled.

A mes beaux frères Yousef et Walid, d'avoir été comme des frères pour moi.

A tous les membres de la famille Ben Ali Khodja, qui m'ont entouré de soins surtout ma douce tante Amina, merci pour ton aide.

Ma profonde gratitude à mon enseignante Mme GUESSAIBIA.N, d'avoir été une grande inspiration.

A l'amie de plus de 18 ans, Nesrine tu as été plus qu'une sœur pour moi, merci d'être présente à mes côtés.

A ma partenaire et meilleure amie Zineb, je te remercie pour ton soutien et ton aide et ta gentillesse, merci de m'avoir supporté dans les moments difficiles, et pour cette inoubliable expérience qu'on a passé ensemble.

A mes collègues de promotion de Génétique 2013-2016, merci pour les bons souvenirs ensemble.

A tous ceux qui me connaissent de près ou de loin.

Dédicace de Zedmia Zineb

Merci à notre Seigneur Dieu le tout puissant, pour sa grâce, le courage qu'il m'apporté et de m'avoir guidé tout le long de ce travail et dans ma vie.

Je dédis ce Mémoire à mes très chère parents, Ma mère qui a toujours été a mes cotés et m'as encouragé jusqu'au bout dans mes études, Merci Maman pour ta patience avec moi que Dieu te garde dans ma vie. A mon père, qui grâce a lui j'en suis ici, tu m'as encouragé à poursuivre mes études jusqu'au bout, tu as été une source d'inspiration pour moi que ce soit dans ma vie professionnel ou personnel, que Dieu te prête longue vie à mes cotés.

A mes chère petits frères Sidali et Rachid pour leur amours et les moments d'humour qui me remonte le morale.

A mes deux grandes mères, pour leurs prières et encouragements.

A ma famille Zedmia et ma famille Kessoum.

A mes deux meilleurs amies et sœurs de cœur Safia et Lydia, pour les bons souvenirs ensemble et le soutiens dans les moments difficile.

A ma partenaire et chère amie Fatima Zohra, on a passé de moments mémorable durant nos années d'études ensemble et j'ai beaucoup appris grâce à toi.

A mes enseignants qui m'ont tant appris durant ces 5 années d'étude.

A mes collègues de promotion de Génétique 2013-2016.

Enfin, a tous ceux que j'aime et qui m'ont encouragé et soutenue dans ma vie.

Remerciements :

Nous adressons nos remerciements aux personnes qui nous ont aidées dans la réalisation de ce mémoire.

En premier lieu, on remercie **Pr MEGHLAOUI :**
Professeur en immunologie, chef d'unité d'immunologie du CHU de Blida, enseignant d'immunologie à la faculté de Médecine de Blida. Merci de nous avoir accueillies dans votre établissement et de nous avoir ouvert vos portes pour plus de connaissance et de savoir autour de votre personnel.

A notre Encadreur **Dr ZELTNI :**
Assistant à l'unité d'immunologie du CHU de Blida, Merci de nous avoir fait l'honneur de nous encadrer durant notre travail, de nous avoir transmis votre savoir, d'avoir été patient avec nous et de nous offrir votre aide et votre temps, Merci pour vos nombreux conseils qui serviront dans notre avenir professionnel, on a appris tellement de choses à vos cotés et on est très reconnaissantes pour cette chance.

A notre Co-Promotrice **Mme GUESSAIBIAN :**
Maitre de conférence à l'université SAAD DAHLEB Blida, Merci Madame d'avoir accepté de nous co-encadrer, étant vos étudiantes en Master 1 on n'a gardé que de bon souvenirs, vous nous avez été d'une grande inspiration, on a appris beaucoup grâce à vous.

A **Mme ROUAKI.F** et **Mme ZERROUTI** pour leur gentillesse d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Au **Dr BOUCHDOUB :**
Merci Monsieur pour l'aide que vous nous avez apportée, d'avoir répondu à toutes nos questions, de nous transmettre votre savoir et vos conseils que Dieu vous garde.

A **Mr KHARBECH :**
Technicien de laboratoire, Merci Monsieur pour l'aide que vous nous avez apporté, nous avons beaucoup appris à travers votre expérience et votre savoir, Merci pour vos encouragements et vos conseils.

A **Mlle KHLIFATI :**
Merci de nous avoir mise à l'aise et d'avoir su nous guider durant notre stage pratique.

A **Dr BABASASI :**
Merci Madame pour votre aide en nous accordant du temps pour nous transmettre votre savoir et vos conseils qui nous ont été très utiles.

Merci a nos enseignants qui ont participé à notre formation durant nos cinq ans d'études.

A tout le personnel du laboratoire d'immunologie CHU BLIDA, Merci.

Résumé

L'insuffisance rénale chronique est définie par la diminution progressive et irréversible du débit de filtration glomérulaire. La transplantation rénale constitue une véritable révolution pour les patients atteints d'une insuffisance rénale chronique terminale. Les antigènes d'histocompatibilité HLA furent désignés comme antigènes de transplantation. La compatibilité HLA a été diversement appréciée quant à son réel impact sur la survie des greffons, en raison notamment de l'hétérogénéité entre les pratiques de greffe, la qualité des typages HLA des donneurs et receveurs et donc leur appariement.

Les Objectifs de notre travail sont représentés d'abord par une étude cas/témoins qui consiste à trouver une association des allèles HLA et la maladie rénale chronique, ensuite de réaliser une étude de la fréquence des allèles HLA ainsi que les haplotypes chez une population Algérienne saine.

Pour cela, une étude rétrospective a été menée au service d'immunologie CHU de Blida sur 110 dossiers incluant donneurs et receveurs s'étalant sur une période de 6 ans. L'étude cas/témoins a été révélée négative, nous avons trouvé qu'il n'y pas d'association entre les allèles HLA et l'insuffisance rénale chronique.

les allèles les plus fréquents sont : A*02(22.7%), A*30(12.1%), B*44(11.6%), B*50/B*51(9.6%),C*07(23.2%),C*06 (11.6%),DRB1*04(17.2%), DRB1*03(14.1%), DQB1*03 (30.3%), DQB1*02 (24.7%) .

Les haplotypes les plus fréquemment retrouvés sont :

- Association A-B-C : A02B50C06 ,A02B45C16 , A02B07C07 et A33B14C08
- Association A-B : A02B45 , A02B50 , A02B07, A02B51, A30B44
- Association A-C : A01C07, A02C06, A30C17, A02C16

Nos résultats sont proches des fréquences tunisienne et marocaine et d'autres populations caucasiennes.

Mots clés : IRCT, typage HLA, PCR-SSP, Polymorphisme HLA.

Liste des tableaux

Tableau I : Epidémiologie de l'IRC dans le monde.....	04
Tableau II : Classification des stades d'évolution de la maladie rénale chronique...05	
Tableau III : Association HLA et Maladies.....	23
Tableau IV : Les caractéristiques générales des patients et sujets témoins.....	34
Tableau V : Fréquences des allèles HLA-A chez les patients IRCT et les témoins.....	34
Tableau VI : Fréquences des allèles HLA-B chez les patients IRCT et les témoins.....	35
Tableau VII : Fréquences des allèles HLA-C chez les patients IRCT et les témoins.....	36
Tableau VIII: Fréquences des allèles HLA-DRB1 chez les patients IRCT et les témoins.....	37
Tableau IX : Fréquences des allèles HLA-DQB1 chez les patients IRCT et les témoins.....	37
Tableau X : Les caractéristiques générales des sujets sains.....	38
Tableau XI : Fréquences haplotypiques chez la population Algérienne.....	44
Tableau XII : Comparaison des fréquences HLA de cette population avec ceux d'autres pays.....	46
Tableau XIII : Haplotypes en commun avec d'autre populations.....	47

Liste des Figures

Figure 01 : Voies de reconnaissance des allogènes par les lymphocytes T	10
Figure 02 : Carte physique de la région chromosomique human leukocyte antigène (HLA)..	13
Figure 03 : Nombre d'allèles HLA par an à partir de 1987 jusqu'à la fin de Mars 2016.....	14
Figure 04 : Transmission familiale des haplotypes human leukocyte antigen.....	15
Figure 05 : Exemples de déséquilibre de liaison.....	16
Figure 06 : Nomenclature des allèles HLA.....	17
Figure 07 : Gènes HLA de classe I.....	17
Figure 08 : Molécules HLA de classe I.....	18
Figure 09 : Gènes HLA de classe II.....	18
Figure 10 : Molécules HLA de classe II.....	19
Figure 11 : Présentation des peptides par les molécules HLA de classe I et classe II.....	21
Figure 12 : Différents composant de la réaction PCR.....	27
Figure 13 : Premier Cycle de la réaction PCR.....	28
Figure 14 : Amplification exponentielle de la région d'ADN bicaténaire de départ.....	29
Figure 15 : A, B principe de la PCR-SSP.....	30
Figure 16 : Contrôle de la PCR-SSP sur gel d'agarose en classe I et II.....	32
Figure 17 : la répartition des sujets selon les régions géographiques.....	38
Figure 18 : Graphe des fréquences des allèles HLA-A.....	39
Figure 19 : Distribution des allèles HLA-A selon les régions géographiques.....	39
Figure 20 : Graphe des fréquences des allèles HLA-B.....	40
Figure 21 : Distribution des allèles HLA-B selon les régions géographiques.....	40
Figure 22 : Graphe des fréquences des allèles HLA-C.....	41
Figure 23 : Distribution des allèles HLA-C selon les régions géographiques.....	41
Figure 24 : Graphe des fréquences des allèles HLA-DRB1.....	42
Figure 25 : Graphe des fréquences des allèles HLA-DQB1.....	42
Figure 26 : Distribution des allèles HLA-DRB1 selon les régions géographiques.....	43

Figure 27 : Distribution des allèles HLA-DQB1 selon les régions géographiques.....43

Liste des abréviations

ACD : Acide-Citrate-dextrose

CHU : Centre Hospitalo-universitaire

DFG : Débit de filtration glomérulaire

DP : Dialyse Péritonéale

DPA : Dialyse Péritonéale automatique

DPCA : Dialyse Péritonéale continue Ambulatoire

D/R : Donneur et Receveur

EHPAD : Etablissement d'hébergement pour personne Agée dépendante

EFI: European Federation for Immunogenetics

FAV : Fistule Artério-veineuse

HLA: Human Leucocyte Antigens

HTA : Hypertension artérielle

IRCT : Insuffisance rénale chronique terminal

MRC : Maladie rénale chronique

NK: Natural Killer

OR: Odds ratio

PCR : Polymérase chaine réaction

PCR-SSP: Polymérase chaine réaction-specific Primers .

ملخص

يعرف مرض الكلى المزمن (IRC) من خلال الانخفاض التدريجي والذي لا رجعة فيه في معدل الترشيح الكبيبي (DFG) وهو أفضل مؤشر لقياس مدى وظيفة الكلى. يمثل زرع الكلى أفضل علاج لمرضى الفشل الكلوي المزمن في المرحلة النهائية (IRCT) والذين لا يملكون الا تصفية الكلى كعلاج ملطف للحياة.

نظام HLA هو عبارة عن مجموعة من الجينات التي يتم التعبير عنها في شكل مستضدات على سطح معظم الخلايا في الجسم، ويتميز هذا النظام بتعدد الاشكال البنيوية بفضل لوم الوراثة والتوزيع السكاني. تصنيف HLA هو تحديد هذه المستضدات المميزة للفرد، غالبا ما ترتبط بعض أنواع HLA مع بعض الأمراض، ويعتبر هذا التصنيف معيار هام للتشخيص الجزيئي.

منذ ظهور تكنولوجيا PCR، ودرس التنوع الجيني على مستوى الحمض النووي الجيني من خلال تقنيات البيولوجيا الجزيئية. اخترنا PCR-SSP.

تتمثل أهدافنا الاولى لدراسة حالة /شاهد على إيجاد رابطة الأليلات HLA وأمراض الكلى المزمنة، ثم دراسة تواتر الأليلات HLA والنسخ المتنوعة لدسكان الجزائر ذوي صحة جيدة.

لهذا، تم إجراء دراسة محتملة بمصلحة المناعة في مستشفى الجامعي بالبلدية على 110 ملف بما فيهما الجهات المانحة والمستفيدة التي تغطي فترة 6 سنوات.

وكشفت الدراسة حالة /شاهد نتائج سلبية، وجدنا أنه لا يوجد أي ارتباط بين أليلات HLA والفشل الكلوي المزمن.

الأليلات الأكثر انتشارا هي (22.7%)، A * 02 (12.1%)، A * 30 (11.6%)، B * 44 (9.6%)، B * 51 / B * 50، C (23.2%)، (* 07)، C * 06 (11.6%)، DRB1 * 04 (17.2%)، DRB1 * 03 (14.1%)، DQB1 * 03 (30.3%)، DQB1 * 02 (24.7%).

تم العثور على النسخ المتنوعة الأكثر انتشارا:

ارتباط A-B-C : A02B50C06 , A02B45C16 , A02B07C07 et A33B14C08

ارتباط A-B : A02B45 , A02B50 , A02B07, A02B51, A30B44

ارتباط A-C : A01C07, A02C06, A30C17, A02C16

نتائجنا قريبة من الترددات التونسية والمغربية وغيرها من شعوب القوقاز.

كلمات مفتاحية: IRCT، تصنيف HLA، PCR-SSP HLA، تعدد الاشكال البنيوية HLA.

Introduction

L'insuffisance rénale chronique est définie par une baisse progressive du débit de filtration glomérulaire qu'on peut estimer par la clairance de la créatinine. Cette maladie constitue un problème de santé publique, vu son coût direct en matière d'hémodialyse et de médication, et indirect en matière d'absentéisme. De ce fait, le développement de la transplantation d'organes comme le traitement de suppléance de première intention et le traitement définitif de l'insuffisance rénale chronique terminale est obligatoire (Joulali T, 2011). 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 faisant intervenir aussi bien les mécanismes de l'immunité cellulaire que ceux de l'immunité humorale. Les études de greffes de peau intrafamiliales chez des volontaires puis les résultats de la transplantation rénale ont permis de considérer le système HLA comme le système majeur régissant les lois de la compatibilité tissulaire, pour cela la réalisation d'un typage des gènes HLA chez le receveur et le donneur d'organe est indispensable. (Cesbron Gautier .A *et al*, 2007).

Depuis sa découverte, le complexe majeur d'histocompatibilité de l'homme, représente l'un des domaines les plus explorés de la recherche scientifique et médicale. La région HLA, située sur le chromosome 6, a totalement été séquencée en 1999. Plus de 200 gènes ont été identifiés, dont les principaux sont les gènes d'histocompatibilité HLA de classe I (A, B, C essentiellement) et de classe II (DR, DP, DQ). (Bricka .C *et al*, 2015)

Le système HLA est caractérisé par un extrême polymorphisme, chaque gène ayant plusieurs allèles codants pour des protéines différentes. La nomenclature de Avril 2016, répertorie 14437 allèles HLA (10730 classe I, 3743 classe II) (hla.alleles.org/nomenclature).

L'étude de polymorphisme HLA a fourni des informations précieuses pour comprendre les relations génétiques entre les populations de différentes ethnies ainsi que l'influence de l'environnement et le flux migratoire sur la population mondiale actuelle. Les fréquences des allèles et des haplotypes HLA ainsi que le fort déséquilibre de liaison entre les loci HLA voisins sont à l'origine des différences observées entre plusieurs populations de différentes régions géographiques.

Les comparaisons entre les populations en utilisant les distances génétiques calculées à partir de fréquences d'allèle HLA ont conduit à dessiner leur histoire.

Les marqueurs HLA sont des outils utiles pour déterminer les origines des populations. (Hajjej.A *et al*, 2005)

Notre travail s'agit d'une étude rétro prospective réalisé au niveau de l'unité d'immunologie CHU Hassiba Ben Boulaïd de Blida, porté sur 110 couples donneurs/receveurs provenant majoritairement de la région du centre Algérien ,ce travail a pour objectifs :

1-Rechercher l'existence d'une association entre les gènes HLA et l'insuffisance rénale chronique.

2-Etudier les fréquences alléliques et haplotypiques des gènes HLA dans la population étudiée.

3-Comparer nos résultats avec ceux des pays voisins et constater la relation de notre population avec les autres ethnies.

I.1. Insuffisance rénale :

L'insuffisance rénale se définit comme un état pathologique dans lequel les reins fonctionnent en dessous du niveau normal par rapport à leur capacité d'évacuer les déchets, de concentrer l'urine et de maintenir l'équilibre hydro-électrolytique, la pression sanguine et le métabolisme du calcium (Dussol, 2011). La vitesse d'évolution de l'insuffisance rénale permet de différencier :

- **L'insuffisance rénale aiguë (IRA) :** lorsque l'insuffisance rénale évolue en quelques heures à quelques jours.
- **L'insuffisance rénale rapidement progressive (IRRP) :** lorsque l'insuffisance rénale évolue en quelques jours à quelques semaines.
- **L'insuffisance rénale chronique (IRC) :** lorsque l'évolution se fait sur un mode plus lent en quelques mois à quelques années. Les principaux éléments sémiologiques sont la présence ou non d'une hypertension artérielle (HTA), d'œdème ou d'un syndrome urinaire : protéinurie ou anomalie du sédiment urinaire, hématurie, cylindres hématiques, leucocytaires. (Boubchir, 2004)

I.2. Epidémiologie :

En 2015, plus de 1 adulte sur 10 souffre d'une affection rénale, soit plus de 600 millions dans le monde. En raison d'un diagnostic tardif, des millions de personnes décèdent prématurément d'insuffisance rénale chronique ou de ses complications cardiovasculaires chaque année. Or, les maladies rénales, même si elles sont le plus souvent silencieuses, peuvent être détectées et leur évolution ralentie, voire stoppée. (Boitard et Cherbut, 2015).

Les sujets d'origine africaine ont un risque au moins triple de développer une insuffisance rénale chronique, notamment comme complication du diabète ou de l'hypertension artérielle. (Boitard et Cherbut, 2015)

Selon le secrétaire général de la société algérienne de néphrologie, en 2011, plus de 14 500 patients ont été traités par hémodialyse, près de 400 patients ont bénéficié de la dialyse péritonéale, et plus de 1 000 patients vivaient avec un greffon fonctionnel, dont plus de 900 ont été transplantés en Algérie. (Hadj-Safi, 2013)

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Tableau I : Épidémiologie de l'IRC dans le Monde (Choukroune, 2013)

	Incidence	Prévalence	Mortalité
USRDS	400 pour 10⁶	1000 pour 10⁶	20 %
Japon	260 pour 10⁶	1400 pour 10⁶	10 %
Amérique latine	180 pour 10⁶		16 %
EDTA	145 pour 10⁶	480 pour 10⁶	15 %
France	150 pour 10⁶	500 pour 10⁶	15 %

- Incidence en augmentation de 3 à 7% par an depuis 10 ans.
USRDS : United States Renal Data System
EDTA : European Dialysis and Transplant Association

I.3. Définition et classification de la maladie rénale chronique :

La maladie rénale chronique (MRC) est définie indépendamment de sa cause, par la présence, pendant plus de 3 mois, de marqueurs d'atteinte rénale ou d'une baisse de DFG (débit de filtration glomérulaire) estimé au-dessous de 60 ml/min/1,73m².

Les maladies du rein peuvent être diagnostiquées sans connaissance de sa cause. Les lésions rénales sont habituellement déterminées par des marqueurs plutôt que par une biopsie rénale. Les stades antérieurs de la maladie rénale chronique peuvent être détectés grâce à des examens de routine en laboratoire (voir Tableau II). (Levey *et al*, 2003)

Tableau II : Classification des stades d'évolution de la maladie rénale chronique (HAS, 2012)

Stade	DFG (ml/min/1,73 m²)	Définition
1	≥ 90	Maladie rénale chronique* avec DFG normal ou augmenté
2	entre 60 et 89	Maladie rénale chronique* avec DFG légèrement diminué
3	Stade 3A : entre 45 et 59	Insuffisance rénale chronique modérée
	Stade 3B : entre 30 et 44	
4	entre 15 et 29	Insuffisance rénale chronique sévère
5	< 15	Insuffisance rénale chronique terminale

I.4. Etiologie de l'insuffisance rénale chronique :

Les principales causes d'IRT sont : (Agence de biomedecine, 2014)

- néphropathies vasculaires et hypertensives (25%)
- néphropathies diabétiques (30%, essentiellement diabète type 2)
- glomérulonéphrites chroniques (10%),
- néphropathies héréditaires (8%, essentiellement polykystose rénale autosomique dominante).
- néphropathies interstitielles chroniques (moins de 5%),
- néphropathies d'origine indéterminée (20%) ;

- **Néphropathie diabétique :**

La néphropathie diabétique représente une des principales causes d'insuffisance rénale terminale dans les pays industrialisés, Elle est caractérisée sur le plan histologique par un épaississement de la membrane basale glomérulaire et par une expansion mésangiale, essentiellement liée à un dépôt de matrice extracellulaire.

Sur le plan clinique, on retrouve essentiellement une protéinurie de type glomérulaire sélective, d'installation lentement progressive, pouvant dans de rares cas prendre la forme d'un syndrome néphrotique. (Weekers *et al*, 2003)

- **HTA et insuffisance rénale :**

La circulation intra-rénale est perturbée précocement dans l'HTA quelle que soit son étiologie et en l'absence de toute manifestation clinique ou complication.

L'HTA est à l'origine des conséquences suivantes :

- Altération de l'irrigation rénale.
- Ischémie des glomérules par néphro-angiosclérose,.
- Réduction du débit sanguin rénal,
- Perte progressive de l'adaptation de l'excrétion urinaire aux excès tensionnels,
- Installation ou aggravation du déficit rénal.

L'HTA comporte toujours des perturbations hémodynamiques intra-rénales qui a pour conséquence : élévation néfaste de la pression glomérulaire qui donne une glomérulosclérose et une insuffisance rénale. (Remache, 2001)

- **Néphropathie Glomérulaire :**

Les néphropathies glomérulaires représentent la troisième cause d'IRT. Les néphropathies glomérulaires les plus souvent en cause sont la néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA (maladie de Berger), la hyalinose segmentaire et focale, la glomérulonéphrite membrano-proliférative (GNMP) et les glomérulonéphrites lupiques. (Boubchir, 2004)

Le risque de développer une insuffisance rénale chronique est élevé chez certains Individus, ce qui justifie un dépistage annuel :

- hypertendus
- diabétiques
- âgés de plus de 60 ans
- obèses (IMC > 30 kg/m²)
- ayant des infections urinaires récidivantes, des lithiases urinaires récidivantes ou un obstacle sur les voies excrétrices
- ayant une diminution (congénitale ou acquise) de leur capital néphronique
- exposés à des substances néphrotoxiques (médicaments ou toxiques)
- ayant des antécédents familiaux de maladie rénale
- ayant une maladie auto-immune
- ayant des infections systémiques. (Agence de biomedecine, 2014)

I.5 Traitements de l'IRCT :

I.5.1. Dialyse :

La dialyse est habituellement indiquée lorsque le DFG est inférieur à 10ml/min/1,73m² ou lorsqu' apparaissent les premières manifestations cliniques du syndrome d'insuffisance rénale terminale. Les contre-indications au traitement par épuration extra-rénale sont rares et appréciées par le néphrologue au cas par cas.

La dialyse péritonéale (DP) est ambulatoire et réalisée de manière quotidienne : en journée, DPCA ou nocturne, DPA. Malheureusement, il faut savoir que l'épuration extra-rénale (ERR) n'apporte qu'une suppléance exocrine incomplète et une suppléance endocrine nulle (jusqu'à présent un énorme appareil ne peut pas remplacer toutes les fonctions exocrines et endocrines d'un rein sain qui pèse de 100 à 150 g). (HAS, 2012)

Complication de l'hémodialyse

Les contraintes de l'hémodialyse sont psychosociales (dépendance, perturbation de la vie socioprofessionnelle), diététique (restriction en eau, en potassium, et en phosphore), thérapeutique (anticoagulants), économique (cout élevé), abord vasculaire (cathéter, FAV fistules artério-veineuses). Les complications à court terme sont : l'intolérance per dialytique, les thromboses, l'infection de l'abord. Les complications à long terme sont cardio-vasculaire, infectieuse, ostéoarticulaire (hyperparathyroïdie secondaire, amylose à β -2 microglobuline) (Joulali, 2011)

I.5.2 La transplantation :

La transplantation rénale consiste à remplacer le rein défaillant d'un patient par un rein fonctionnel prélevé chez un donneur dans le but de restaurer une fonction rénale normale. Deux types de donneurs sont principalement utilisés : les donneurs vivants, personnes volontaire compatible ayant un lien de parenté ou étant affectivement liée avec le patient, et les donneur décédés en état de mort encéphalique. (Leroux, 2010)

I.5.2.1 Le bilan biologique en prétransplantation :

Le bilan comporte une exploration immunologique et des examens biologiques

-Une exploration immunologique

- Détermination du groupe sanguin A, B, O.
- Recherche d'anticorps irréguliers antiérythrocytaires (agglutinines irrégulières).
- Cross match initial
- Le typage HLA A ,B,C,DR ,DQ.
- Recherche d'anticorps d'allo-immunisation anti-HLA.
- Epreuve d'histocompatibilité : Cross match . (HAS, 2012)

-Des examens biologiques

- Bilan général : numération formule sanguine, protéine C-réactive, plaquettes, coagulation,
- fibrinogène, bilan lipidique, glycémie à jeun et postprandiale, hémoglobine glyquée.
- Bilan hépatique, calcémie, phosphorémie , parathormone.

- Sérologies virales : hépatites B, C et A ; sérologie CMV, EBV, herpès virus, HIV1, HIV2,
- HTLV1, HTLV2, syphilis, toxoplasmose. (HAS, 2012)

I.6. Types de rejet en transplantation :

I.6.1 Rejet hyperaigu :

Le rejet hyperaigu apparaît dans les minutes suivant l'introduction du greffon dans l'organisme et concerne uniquement les greffes vascularisées.

Ce rejet, très rapide, est caractérisé par une thrombose des vaisseaux qui provoque la nécrose du greffon. Le rejet hyperaigu est dû à la présence chez le receveur d'anticorps anti-donneur préformés. Les anticorps entraînent l'activation du complément et une stimulation de la cellule endothéliale qui va sécréter, entre autres, le facteur pro-coagulant Von Willebrand provoquant l'adhésion et l'agrégation des plaquettes. Ces anticorps préformés sont naturels (comme les anticorps anti-A et B des groupes sanguins) ou acquis lors de situations immunogènes antérieures. Les anticorps acquis reconnaissent notamment des déterminants du CMH, anticorps anti-HLA chez l'homme. De nos jours, ce type de rejet est évité dans la majorité des cas par l'analyse des compatibilités HLA entre le donneur et le receveur. (Cai et Terasaki, 2005)

I.6.2 le rejet aigu :

Le rejet aigu est dû à la réaction du système immunitaire contre le greffon et peut survenir d'une semaine à plusieurs mois après la transplantation. (Finke et Marks, 2006)

Actuellement, grâce aux traitements immunosuppresseurs, les épisodes de rejet aigu surviennent dans moins de 15 % des transplantations chez les patients non immunisés.

Le rejet aigu peut être le résultat de deux mécanismes immunologiques qui peuvent agir seuls ou ensemble: (Finke et Marks, 2006)

- un processus dépendant des lymphocytes T, qui correspond au rejet cellulaire aigu (voir Figure 1).
- un processus dépendant des lymphocytes B générant le rejet humoral aigu.

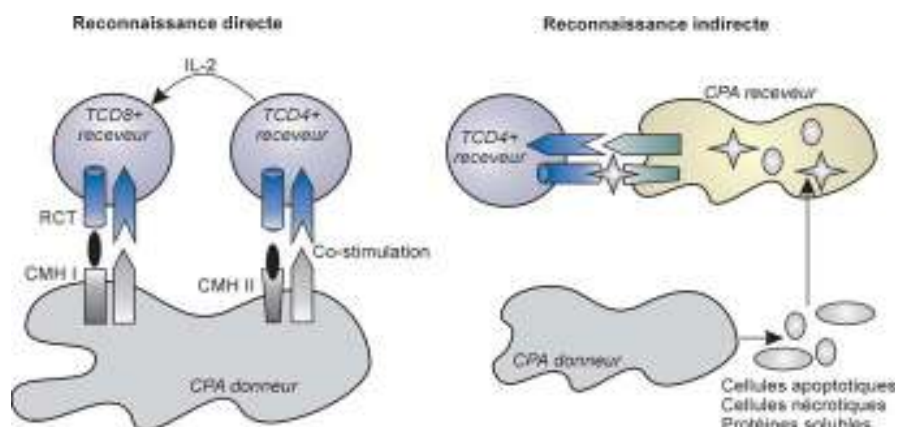


Figure 1 : Voies de reconnaissance des alloantigènes par les lymphocytes T (Golshayan *et al*, 2007)

I.6.3 Le rejet chronique :

Le rejet chronique consiste en une augmentation de l'intima entraînant une diminution du calibre des vaisseaux, puis une destruction de la limitante élastique interne. L'épaississement est lié à une accumulation de matrice extracellulaire et à la prolifération de cellules myofibroblastiques. A la périphérie du vaisseau, une accumulation de macrophages et de lymphocytes T CD4 est observée. En revanche, les lymphocytes T CD8 sont rarement présents. Dans certains cas, des structures adoptant une organisation lymphoïde sont décrites. Elles comportent en majorité des lymphocytes B capables de synthétiser des anticorps dirigés contre le donneur. Ces lésions ont été mises également en évidence au niveau de greffons rénaux, ce phénomène est dénommé organogenèse lymphoïde tertiaire. Elle participe ainsi à la pérennisation du rejet chronique et possiblement à maintenir localement des lymphocytes T et B mémoires capables de synthèse de cytokines et d'anticorps. Les mécanismes de survie de ces lymphocytes et leur sensibilité aux différentes drogues immunosuppressives restent à démontrer et constituent un enjeu important pour le traitement du rejet chronique. (Bernard *et al*, 2009)

I.7 Le système HLA:

La découverte du système HLA a connu plusieurs étapes établies à travers des différents travaux au cours de l'histoire. C'est à Peter Gorer que l'on doit la découverte du complexe H-2. En 1936, par agglutination des globules rouges, il découvrait un premier antigène chez la souris par greffes de tumeurs entre souris de lignées différentes. (Dausset et Pla, 1989)

En 1958, le professeur Jean Dausset découvrait le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), aussi appelé « Système HLA » (pour Human Leucocyte Antigens) chez l'homme. Les molécules

HLA présentes à la surface des cellules permet la reconnaissance du « soi » par le système immunitaire. En cas de transplantation d'organe, étant donné que ces molécules sont différentes d'un individu à l'autre, ces derniers sont en général considéré comme étrangères par le système immunitaire du receveur, déclenchant une réaction de défense qui peut amener à un rejet. (Bernard *et al*, 2009)

En 1969, Patel et Terasaki apportèrent une preuve convaincante de la responsabilité des anticorps anti-HLA dans la survenue des rejets de type humoral et décrivaient la technique du cross-match par microlymphocytotoxicité dépendante du complément (Zuber S *et al*, 2007),

I.7.1 Localisation des gènes HLA :

La localisation des gènes HLA a été confirmée par l'étude d'une cellule porteuse d'une translocation d'un fragment transposé du chromosome 6 au chromosome 1 : HLA est situé sur le fragment transposé du chromosome 6, entre la bande 21 et l'extrémité du bras court (6q21-6pter). (Colombani, 1993). Ce CMH comporte trois régions riches en gènes : (voir Figure 2)

- Région de classe I (abritant notamment les gènes HLA dits classiques de classe I -HLA-A, B et Cw- et non classiques -HLA-E, F, G, MIC et HFE)
- Région de classe III (abritant des gènes apparentés ou non au système HLA mais dont un grand nombre est impliqué dans la réponse immune, tels les gènes codant certaines protéines du complément C2, C4, Bf, ou certaines cytokines)
- Région de classe II (abritant les gènes HLA-DR, -DQ et -DP) (Cesbron-Gautier *et al*, 2007)

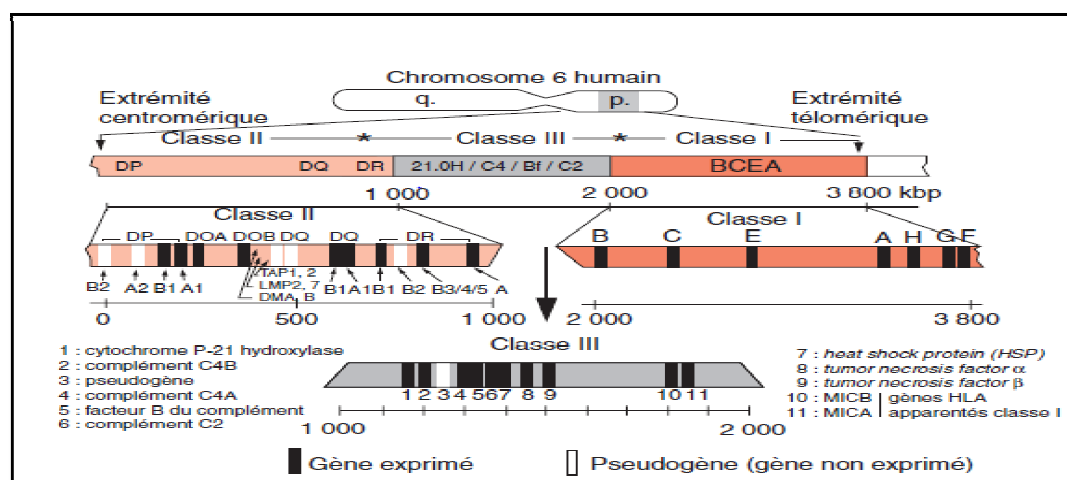


Figure 2 : Carte physique de la région chromosomique human leukocyte antigen (HLA). (Rhodes et Trowsdale, 1999)

I.7.2 Caractéristiques des gènes HLA :

Dans leur ensemble, les gènes HLA possèdent quatre caractéristiques :

*Le Polymorphisme extrême :

C'est par la comparaison des individus de la population générale que peut être défini le polymorphisme du système HLA. Il s'agit donc d'un polymorphisme populationnel expliqué par la présence de nombreux gènes multialléliques et leur transmission codominante. (Eliaou, 2002)

Il existe plusieurs 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 α des molécules HLA de classe I membranaires (voir Figure 3).

Les principales familles de gènes HLA de classe II: HLA-DR, -DQ, -DP, sont constituées de plusieurs gènes. On dénombre au moins 10 gènes au niveau de la famille DR : le gène DRA invariant codant pour la chaîne DR α et neuf gènes DRB dont quatre sont fonctionnels et polymorphes (B1, B3, B4 et B5), codant pour les chaînes DR β .

La molécule membranaire mature HLA-DR est formée de l'association d'une chaîne DR α et d'une chaîne DR β . Seuls les gènes DR β sont responsables du polymorphisme du composant HLA-DR.

En ce qui concerne les composants HLA-DQ et HLA-DP, les gènes DQA, DQB, DPA et DPB sont polyalléliques. (Eliaou, 2007)

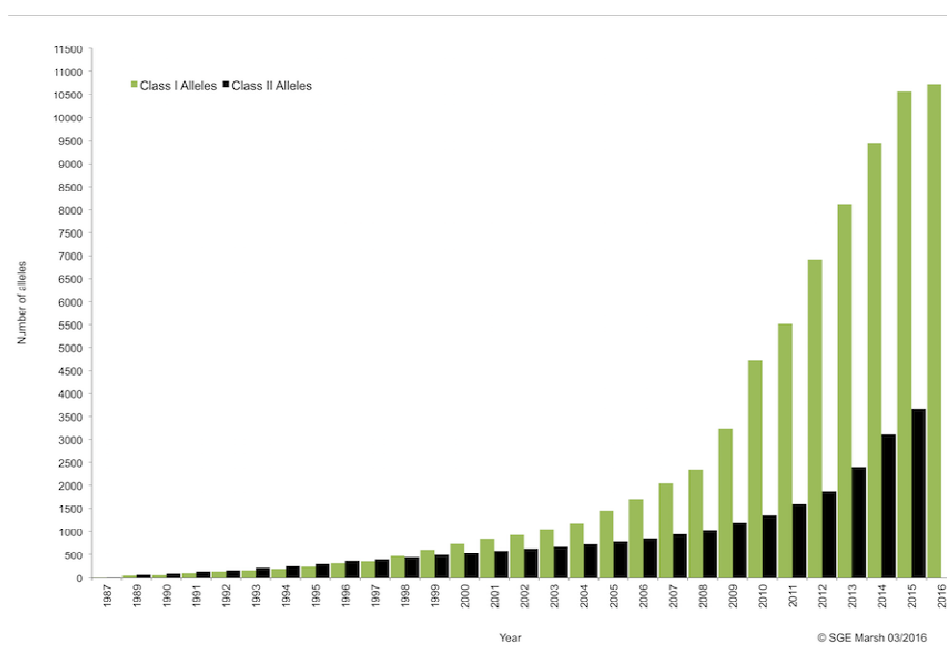


Figure 3 : Nombre d'allèles HLA par an à partir de 1987 à la fin de Mars 2016. (Marsh, 2016)

*Transmission codominante des gènes HLA :

Dans 98 % des cas, l'ensemble des gènes HLA de classes I et II sont transmis «en bloc» à la descendance sans recombinaison chromosomique à la méiose.

Un parent est porteur, sur chaque chromosome 6p, d'une combinaison donnée d'allèles définissant un haplotype. Au total, pour les deux parents, quatre haplotypes sont définis : deux chez le père (notés de façon conventionnelle a et b) et deux chez la mère (notés de façon conventionnelle c et d).

Chaque enfant hérite d'un haplotype venant du père et d'un haplotype venant de la mère.

Tous les produits protéiques correspondant à ces haplotypes sont exprimés à la surface des cellules (voir Figure 4).

Il existe donc quatre combinaisons haplotypiques possibles dans la fratrie : a-c, a-b, b-c, b-d.

Aussi la probabilité pour que deux germains (frères ou sœurs) soit HLA identiques est de 25 %, HLA semi-identiques de 50 % et HLA différents de 25 % . (Cesbron-Gautier *et al.*2007).

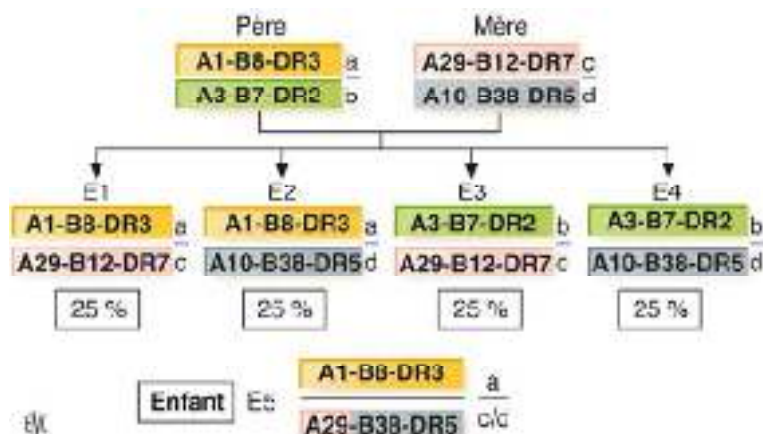


Figure 4 : Transmission familiale des haplotypes human leukocyte antigen (Cesbron-Gautier *et al.*, 2007)

* Liaison étroite :

Les HLA A, B, C, DR, DQ, DP sont distincts mais étroitement liés sur le même chromosome. La transmission des gènes se fait donc en bloc des parents aux enfants, sauf rares recombinaisons (crossing over entre 2 haplotypes paternel et/ou maternel) entraînant l'apparition d'un nouvel haplotype dit recombinant. Ces recombinaisons sont de l'ordre de 0,8 % entre les loci A et B et de 1% entre les loci B et DR. (Cesbron-Gautier *et al.*2007).

*Déséquilibre de liaison :

Étant donné le relatif « brassage des populations », la fréquence des associations d'allèles aux différents locis HLA sur un haplotype donné devrait être théoriquement égale au produit de la fréquence de chacun de ces allèles dans la population. Cependant, certaines combinaisons d'allèles sont observées à une fréquence beaucoup plus élevée que la fréquence théorique attendue. Ce phénomène, appelé « déséquilibre de liaison », est une des caractéristiques fondamentales du système HLA. (Eliaou, 2002)

Exemple : combinaison allélique (haplotype)	
HLA-B8/HLA-DR3	
F_{pop} B8 = 0.10	F_{th} B8-DR3 = (0.10x0.12) 0.012
F_{pop} DR3 = 0.12	F_{ob} B8-DR3 = 0.074
Déséquilibre de liaison (Δ) = 0.062	
Exemples de combinaison d'allèles en déséquilibre de liaison	
	$\Delta x (10^{-3})$
A1, B8	53.2
B7, DR2	36.8
B8, DR3	61.3
DR2, DQ1	93.6
DR4, DQ3	87.5

Figure 5 : Exemples de déséquilibre de liaison.

(Fpop = fréquence dans la population- Fth = fréquence théorique - Fob = fréquence observée) (Eliaou, 2002)

I.7.3 Nomenclature :

La complexité du système a rendu nécessaire une règle d'écriture, à l'échelon international, qui référence clairement les régions géniques (loci), les allèles (gènes) et leur produits (antigènes) HLA. Chaque spécificité antigénique est désignée par la lettre du locus auquel elle appartient (HLA-A pour locus A) suivie de son numéro spécifique (HLA-A2, HLA-B27). Lorsqu'une sous-spécificité sérologique a été définie, on fait figurer la spécificité « large » (*broad*) entre parenthèses à la suite de celle-ci : par exemple, la spécificité d'origine HLA-B5 comprend deux sous-spécificités (*split*) : HLA-B51(5) et B52(5). (BARHET *et al*, 2002)

Pour le locus C, et afin d'éviter toute ambiguïté avec les protéines du complément, la lettre W (pour « Workshop ») est accolée à C (exemple : HLA-Cw2).

On distingue la nomenclature des antigènes définis (par sérologie et/ou technique cellulaire) qui répond aux règles ci-dessus, de celle des gènes (allèles) codant ces produits antigéniques. Dans cette dernière, un allèle est référencé par le locus auquel il appartient suivi d'un astérisque (*) puis de deux chiffres (incluant le 0 si nécessaire) pour désigner la spécificité allélique (voir Figure 6).



Figure 6: Nomenclature des allèles HLA (Torres et Hue Moraes, 2011)

I.7.4 - Structure biochimique des molécules et gènes HLA :

I.7.4.1 les molécules HLA de classe I :

*Gènes :

Les gènes HLA A, B, C sont fonctionnels dans toutes les cellules et codent pour la chaîne α des molécules de classe I. Il existe une homologie de structure entre les gènes A, B, C.

Cette structure est organisée en 8 exons séparés par 7 introns.

Le 1^{er} exon code pour le peptide signal clivé lors du transport intra cellulaire de la molécule et renferme une partie 5' non traduite.

Les exons 2, 3,4 codent respectivement pour les domaines extra cellulaires $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$

Les exons 5, 6,7 et 8 codent respectivement pour la région transmembranaire, la région intracytoplasmique et la région carboxytermine 3' non traduite (voir Figure 7).

Le polymorphisme génique et la variabilité protéique qui en découlent sont concentrés sur les exons 2 et 3 donc sur les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$. (Mackay, 2000)

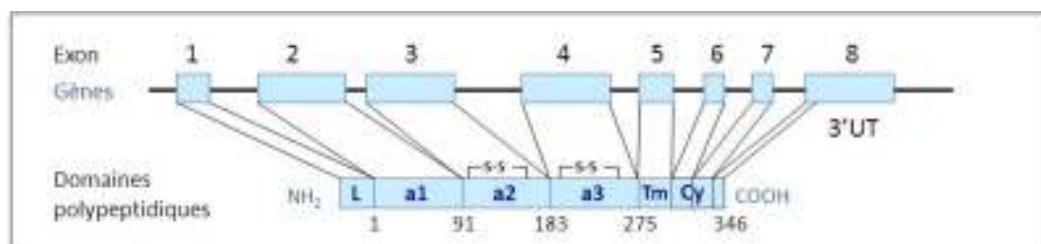


Figure 7 : Gènes HLA de classe I (Goulet, 2012)

*Structure Moléculaire :

Les gènes HLA-A, -B, et -C codent la chaîne lourde α des molécules de classe I (44 kDa), associée de manière non covalente, à la surface de la quasi-totalité des cellules, à la $\beta 2$ microglobuline ($\beta 2m$), chaîne dite légère de 11,5 kDa non codée par le CMH. La chaîne lourde α compte une partie intracytoplasmique, une partie transmembranaire et une partie extracellulaire

composée de trois domaines ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$). La structure tridimensionnelle des molécules HLA de classe I classiques est connue depuis 1987 et explique le rôle fonctionnel de ces molécules dans la présentation de peptides aux lymphocytes T. (Bjorkman *et al*, 1987)

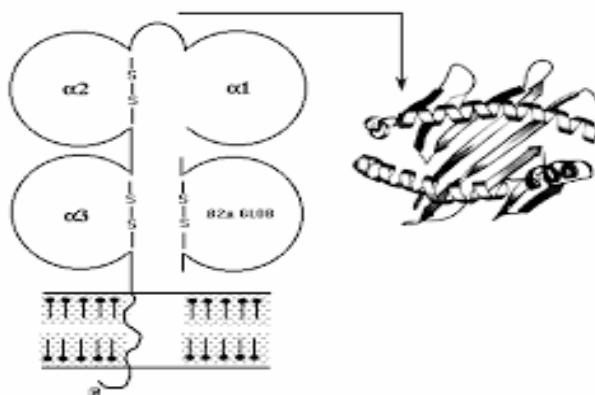


Figure 8 : Molécule HLA de classe I. (Eliaou, 2007)

I.7.4.2 les molécules HLA de classe II :

*Gènes :

La région HLA D ou région de classe II comprend un grand nombre de gènes regroupés en trois sous régions principales : HLA DR ; HLA DQ ; HLA DP. Pour chacun de ces loci, il existe des gènes A (DRA ;DQA ;DPA) qui codent pour une chaîne α et des gènes B (DRB ;DQB ;DPB) qui codent pour chaîne β . L'assemblage de ces deux chaînes constitue la molécule HLA de classe II, il existe une homologie de structure entre les gènes DR, DQ, DP (voir Figure 9). Les gènes A des trois loci et le gène DQB1 possèdent 5 exons, les gènes DPB1 et DRB en possédant 6. Le premier exon correspond à la région 5' non traduite et au peptide signal, les exons 2 et 3 codent pour les domaines extracellulaires, l'exon 4 code pour les régions transmembranaires et cytoplasmiques et l'exon 5 contient l'essentiel de la région 3' non traduite. Dans les gènes DRB et DRB1 la région cytoplasmique est codée par un cinquième exon. (Mackay, 2000)

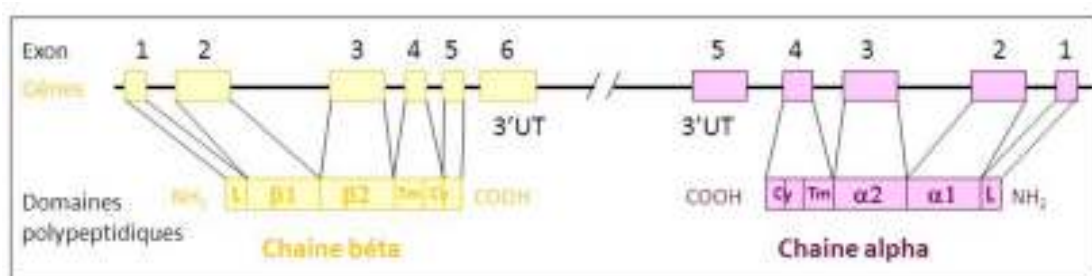


Figure 9 : Gènes HLA de classe II (Goulet, 2012)

*Structure Moléculaire :

Ces molécules appartiennent aux trois séries notées HLA-DR, -DQ et -DP. Ainsi, on distingue les molécules DR, DQ et DP constituées de deux chaînes (a et b) codées par les gènes correspondants notés DRA et DRB, DQA et DQB, DPA et DPB.

La structure tridimensionnelle d'une molécule HLA-DR1, déterminée par cristallographie et diffraction aux rayons X, est similaire à celle d'une molécule HLA de classe I. Au niveau génomique, la réalité est un peu plus complexe car il existe, en raison de duplications géniques, de nombreux gènes ne codant pas (pseudogènes) ou codant des chaînes b supplémentaires dans le cas de certains haplotypes, et particulièrement dans la sous-région DR. Ainsi, selon les individus, on distingue, au niveau de l'expression membranaire, plusieurs molécules de classe II possibles. (Brown *et al*, 1993)

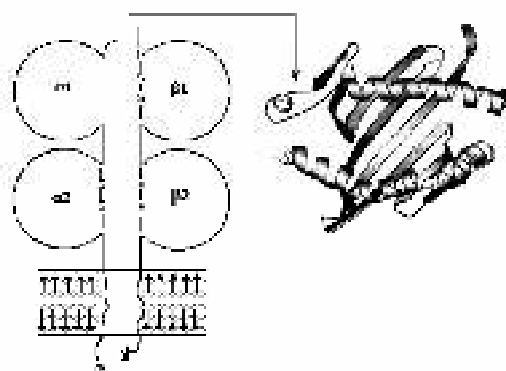


Figure 10 : Molécule HLA de classe II. (Eliaou, 2007)

I.7.5 L'étude du Polymorphisme des gènes HLA :

L'analyse et la dénomination des antigènes HLA se pratiquent habituellement au moyen de test appelé « sérologique » et « Biologie Moléculaire ».

I.7.5.1 Technique Sérologique :

Les méthodes sérologiques recherchent à identifier les protéines exprimées à la surface des cellules à l'aide d'anticorps. On parle alors de phénotypage HLA

La technique de référence est la « microlymphocytotoxicité » utilisée surtout pour le phénotypage du HLA A (24 spécificités), HLA B (52 spécificités), HLA C (18 spécificités) mais elle ne permet de discriminer que peu de spécificité pour HLA II ainsi que DR, DQ, DP. (Benhalima, 2005)

I.7.5.2 Typage par Biologie Moléculaire :

Les technique de la biologie moléculaire offre plusieurs avantages par apport à la méthode sérologique, elle donne le génotypage HLA. Plusieurs techniques existent, toutes passent par une étape PCR (réaction en chaine par polymérase), qui permet d'amplifier la région du gène que l'on veut étudier. (LETTREUCHE R A, 2013)

*** PCR-SSO (sequence specific oligonucléotide):**

Consiste à amplifier la région de l'ADN génomique qui représente un polymorphisme d'intérêt. Les amorces choisies sont localisées dans des régions hautement conservées encadrant la zone polymorphe.

*** PCR-SSP (sequence specific primer) :**

Elle désigne une amplification basée sur l'utilisation d'amorces localisées dans la région polymorphe de façon à permettre une amplification spécifique d'un allèle ou d'un groupe d'allèles.

*** PCR-SRT (sequence based typing) :**

Il consiste à séquencer directement la région polymorphe du gène HLA obtenue par PCR en déterminant la succession des nucléotides qui le composent. (LETTREUCHE R A, 2013)

I.7.6 Expression des molécules HLA :

Les molécules HLA de classe I sont exprimées à la surface de pratiquement toutes les cellules nucléées de l'organisme. Cependant, certains types cellulaires n'expriment pas de molécules HLA de classe I (hépatocytes, par exemple) ou en expriment un taux très faible.

Les molécules HLA de classe II ne sont exprimées que par un nombre réduit de types cellulaires, principalement les cellules dendritiques, les lymphocytes B, les cellules de la lignée myélomonocytaire, les cellules épithéliales thymiques et les lymphocytes T activés.

L'expression membranaire des molécules HLA de classe I et de classe II est régulée par l'action de cytokines. L'interféron c, par exemple, induit, soit une hyperexpression membranaire des molécules HLA de classe II, soit une expression de ces molécules à la surface des cellules qui en sont normalement dépourvues. (Eliaou *et al*, 2002)

I.7.7 Fonction des molécules HLA :

I.7.7.1 Rôle des molécules HLA dans la présentation des antigènes:

Le principale rôle des molécules HLA de classes I et II est de présenter aux lymphocytes T des peptides antigéniques. Ce processus marque le début de la réponse immunitaire spécifique ou adaptative. Les voies de présentation et les zones de rencontre et de prise en charge des peptides antigéniques sont différentes pour les molécules HLA de classe I et de classe II (voir Figure 11).

-Les molécules de classe I présentent des fragments de protéines endogènes sont reconnus par des lymphocytes cytotoxiques T CD8+.

-Les molécules de classe II présentent des protéines exogènes sont reconnus par des lymphocytes auxiliaires T CD4+. (Eliaou et al, 2002)

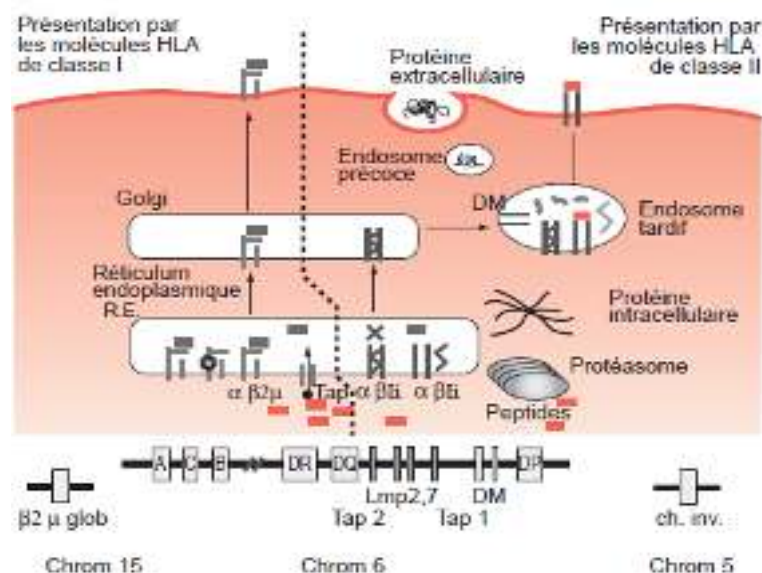


Figure 11 : Présentation des peptides antigéniques par les molécules HLA de classe I (partie gauche de la figure) et de classe II (partie droite de la figure). (Eliaou, 2007)

I.7.7.2 Rôle dans la maturation des lymphocytes T :

C'est au cours de leur transit dans le thymus que les prothymocytes issus de la moelle osseuse vont subir une maturation particulière, leur donnant un statut de lymphocytes T matures « éduqués » à différencier le soi du non-soi. Seuls sont sélectionnés

Les lymphocytes T dont le TCR ne reconnaît que les antigènes HLA du soi (sélection thymique) Cette sélection positive se réalise dans le cortex thymique et les cellules non retenues meurent par apoptose. (von Boehmer *et al* ,1989)

I.7.7.3 Régulation de la cytotoxicité des NK :

Contrairement aux lymphocytes T, dont l'activation repose en particulier sur la reconnaissance d'un complexe CMH du soi/ peptide étranger, c'est l'absence de reconnaissance des molécules HLA de classe I qui active les cellules NK. Les cellules NK sont capables de lyser des cibles qui présentent un défaut d'expression des molécules HLA de classe I (comme les cellules tumorales ou les cellules infectées par un virus) ou qui expriment des molécules HLA étrangères au soi (comme les cellules allogéniques HLA non identiques). Ce mécanisme est nommé « hypothèse du soi manquant » (Ljunggren et al, 1990)

I.7.8 Implication Clinique Du Système HLA :

I.7.8.1 HLA et transplantation d'organes :

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. D'une façon générale, les systèmes de groupes ABO et HLA sont les obstacles majeurs au succès de ces transplantations. Très tôt, les antigènes d'histocompatibilité HLA furent désignés comme antigènes de transplantation. La compatibilité HLA a été diversement appréciée quant à son réel impact sur la survie des greffons, en raison notamment de l'hétérogénéité entre les pratiques de greffe, la qualité des typages HLA des donneurs et receveurs et donc leur appariement. (Opelz G *et al*, 1999)

I.7.8.2 HLA et maladies : (voir Tableau III : Annexe 01).

En 1985, plus de 500 études rapportaient, dans des domaines très variés de la pathologie, des associations HLA-maladies. Pour la plupart, l'association exprimée en termes de risque relatif (RR) restait faible, voire quelquefois infirmée par d'autres études. Pour d'autres maladies bien moins nombreuses, ces associations étaient fortes et retrouvées dans différentes ethnies. Elles ont du reste été confirmées régulièrement lors de nouvelles évaluations utilisant les nouveaux outils de typage par biologie moléculaire des gènes HLA. (Tiwari et Terasaki, 1985)

Objectifs :

- Réaliser une étude d'association des allèles HLA et la maladie rénale chronique.
- L'étude de la fréquence des allèles HLA ainsi que les haplotypes chez cette population Algériennes saine.

II .1 Matériel :

II.1.1 Les patients :

Notre travail a été réalisé au niveau de l'unité d'immunologie de l'hôpital Hassiba Ben Bouali CHU de Blida, nous avons réalisé des typages HLA chez 110 couples (Donneurs/Receveurs) par biologie moléculaire technique de PCR-SSP. Nous avons donc réalisé une étude rétrospective s'étalant sur une période de 6 ans, allant de janvier 2010 à Avril 2016.

Receveurs (R) : les insuffisants rénaux stades terminal transplantés ou en attente de transplantation

Donneurs (D) : les témoins sains

- **les dossiers des patients** : sont composés de :

- fiche de renseignements sur laquelle sont mentionnées des informations relatives à chaque couple.

- une fiche pour le typage HLA par sérologie et une par la biologie moléculaire.

- une fiche pour Sérothèque

- **Prélèvement** :

Prélèvement de sang total sur des tubes ACD (V=8.5ml)

II.1.2 Les réactifs utilisés :

Kit pour extraction d'ADN manuelle : QIAamp®DNA Blood Mini Kit (50)

Kit pour extraction d'ADN automatique : EZ1®DNA Blood 200µl Kit (48)

Kit pour typage HLA classe I (ABC): Micro SSP DNA Typing Tray; Lot 08, 09 et 10

Kit pour typage HLA classe II (DR/DQ) : Micro SSP DNA Typing Trays; Lot 07

II.2 METHODES

II.2.1 Biologie moléculaire :

L'essor de la biologie moléculaire a permis d'augmenter la précision du typage HLA sans ambiguïté au niveau de l'ADN avec une haute résolution par la technique de PCR-SSP qui désormais la meilleure approche permettant la détermination des sous-types d'antigènes HLA très clairement.

II.2.1.1 Extraction de l'ADN génomique :

*Extraction par le kit Quiagène :

Le protocole suivi, pour l'extraction de l'ADN génomique est le suivant :

- Centrifuger à 2000 T/mn pendant 10 min à température ambiante un volume de 8,5 ml de sang total prélevé sur un tube ACD.
- Enlever, à l'aide d'une pipette pasteur, le Buffy-coat au maximum (V=200µl) jusqu'à obtenir un culot bien blanc.
- Mettre un volume de 200µl de Buffy-coat dans un Eppendorf et lui ajouter 200µl de la solution AL et 20 µl de protéase sous forme liquide.
- Remettre en suspension, au Vortex pendant quelques secondes.
- Placer l'Eppendorf dans le thermoblok (pour la dénaturation de l'ADN) pendant 10 min.
- Ajouter 200µl de l'éthanol, et agiter en plaçant l'Eppendorf dans le Vortex pendant quelques secondes.
- Transférer le contenu de l'Eppendorf dans une colonne de QUIAGEN.
- Centrifuger à 13000 tours pendant 1min.
- Jeter la poubelle de la colonne avec son contenu et la remplacer par une autre.
- Ajouter 500µl de la solution AW1 (solution de lavage) et centrifuger la colonne à 13000 tours pendant 1min.
- Jeter la poubelle de colonne et la remplacer par une autre.
- Ajouter 500µl de la solution AW2 et centrifuger à 14000 tours pendant 3min.
- Transférer la colonne à filtre dans un Eppendorf et Ajouter 200µl du tampon AE.
- Laisser l'Eppendorf pendant 5min à une température ambiante.
- Centrifuger à 13000 tours pendant 1min.

Chapitre II : Matériel et Méthodes

- L'ADN est alors prêt pour le typage HLA, après mesure de la densité optique de l'ADN extrait.
- Diviser la quantité de l'ADN sur 2 Eppendorfs comme suit :
 - 50µl → pour le typage HLA de classe II.
 - Le reste → pour le typage HLA de classe I.

***Extraction automatique : (Annexe 02)**

Pour l'extraction d'ADN nous avons utilisé l'automate EZ1 BioRobot de QIAGEN. La technique des particules magnétiques donne à l'ADN une haute qualité. Elle est utile pour une utilisation directe d'amplification ou autre application enzymatique. L'extraction dure 15 minutes. Le tampon ainsi que la protéinase K vont permettre de détruire la structure de l'ADN afin d'éliminer les protéines et de libérer les acides nucléiques. Quand cette étape est terminée, les acides nucléiques sont capturés par les particules magnétiques qui vont être lavées à plusieurs reprises. Lors de l'éluât, l'éluât se détache des billes et celles-ci sont capturées par un système d'aimantation qui les retient. (EZ1® DNA Blood Handbook, 2010)

II.2.1.2 PCR :

***Définition :**

Depuis son invention, la PCR est devenue la technique la plus utilisée pour la détection de l'ADN et de l'ARN. À partir d'une simple copie d'une séquence particulière d'acides nucléiques, cette séquence peut être spécifiquement amplifiée et détectée. Sa nature exponentielle rend cette technique attrayante pour des analyses quantitatives. (Elyse Poitras, 2002)

***Le principe :**

- Utilisation de la propriété de l'ADN polymérase de manière répétitive : synthèse d'un brin complémentaire d'ADN à partir d'une matrice ADN et d'amorces et de la taq polymérase (thermorésistante) + Mg (voir Figure 12)
- Utilisation des propriétés d'hybridation et de déshybridation (dénaturation) des brins complémentaires d'ADN en fonction de la température

Chapitre II : Matériel et Méthodes

- Obtention en quelques heures de plusieurs millions de copies d'une séquence donnée d'ADN.

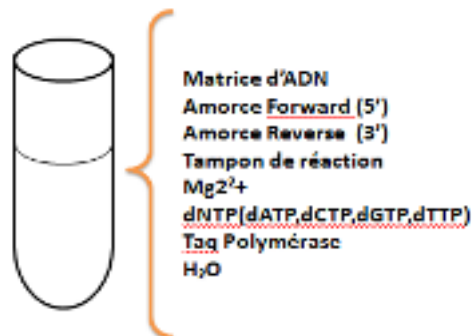


Figure 12: Différents composants de la réaction de PCR

Chaque réaction d'amplification comporte trois étapes se succédant précisément et nécessitant chacune une température différente : (voir Figure 13)

- **Etape de dénaturation :** Le fragment d'ADN est dénaturé. C'est-à-dire que les liaisons hydrogènes qui relient les deux brins d'ADN sont rompues sous l'action de la chaleur (95°). L'ADN double brin est donc transformé en simple brin.
- **Etape d'hybridation :** A la suite de la dénaturation, on obtient deux brins d'ADN. La température descend à environ 55-60°C. Sur ces deux brins d'ADN vont se fixer des amorces. Ces amorces sont des oligonucléotides (un oligonucléotide est une courte séquence de nucléotides simple brin et long d'environ une dizaine de bases).

Les amorces introduites jouent le rôle de « cible » : elles se fixent sur les brins d'ADN et permettent ensuite à la polymérase de faire son travail.

- **Etape d'élongation :** La température remonte à 72°C, température à laquelle l'enzyme ADN polymérase fonctionne le mieux. La polymérase, partant de l'amorce, synthétise le brin complémentaire d'ADN. On obtient ainsi deux fragments d'ADN. Ces trois étapes réalisent un cycle de PCR, elles sont répétées en boucle par le thermocycleur pour former plusieurs cycles.

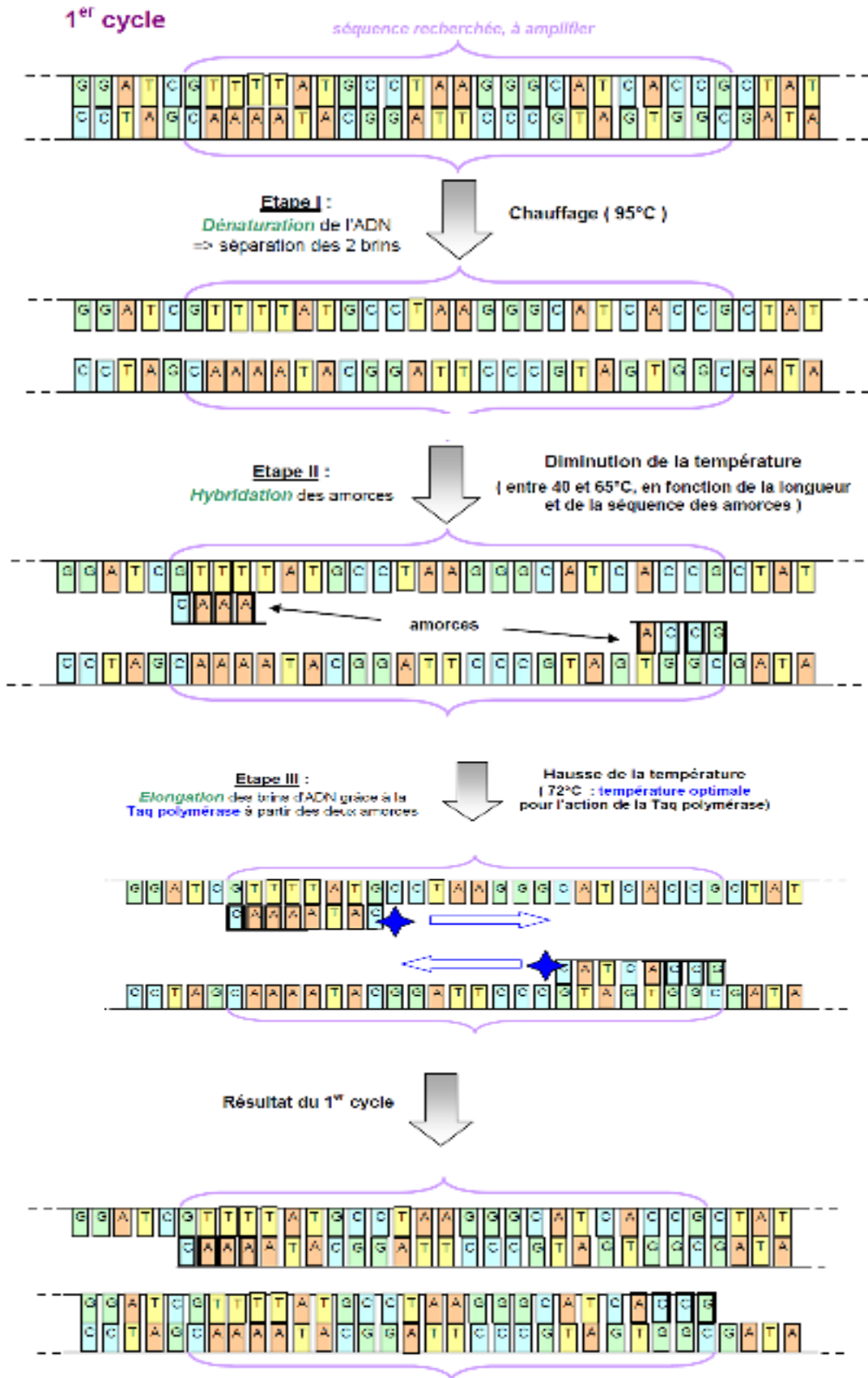


Figure 13: Premier cycle de la réaction PCR

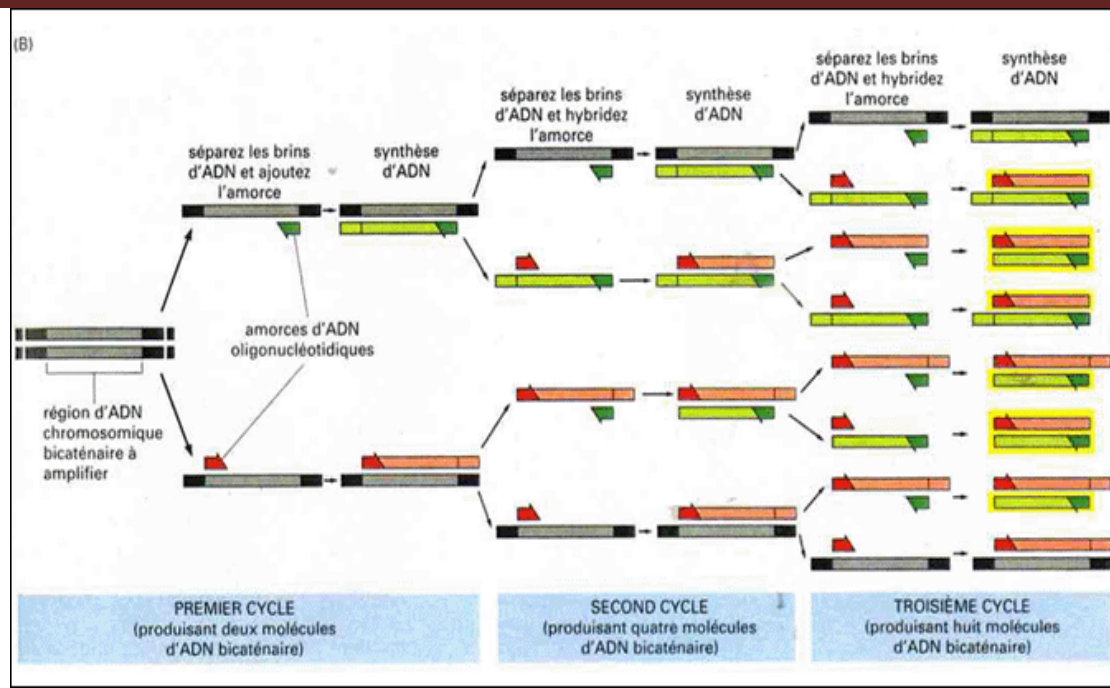


Figure 14: Amplification exponentielle de la région d'ADN bicaténaire de départ

II.2.1.3 PCR-SSP :

Les tests d'histocompatibilité jouent un rôle important dans la sélection des donneurs de moelle osseuse et des reins pour une transplantation.

L'amplification spécifique de la séquence (SSP) est simplement une forme de réaction en chaîne par polymérase (PCR), qui consiste à concevoir un ou deux couples d'amorces de sorte qu'ils peuvent ou non permettre l'amplification (principe 3'-mismatch).

L'amplification des loci HLA avec la PCR -SSP s'est avérée être une méthode rapide et précise pour le génotypage de HLA- A, -B et -C et DR-DQ et indique que le typage HLA par sérologie peut ne pas être suffisamment fiable.

Dans la détermination du polymorphisme allélique par amplification par PCR avec des amorces spécifiques de séquence (PCR - SSP), les amorces Oligo-nucléotidiques sont conçues pour obtenir une amplification des allèles spécifiques.(voir Figure 15)

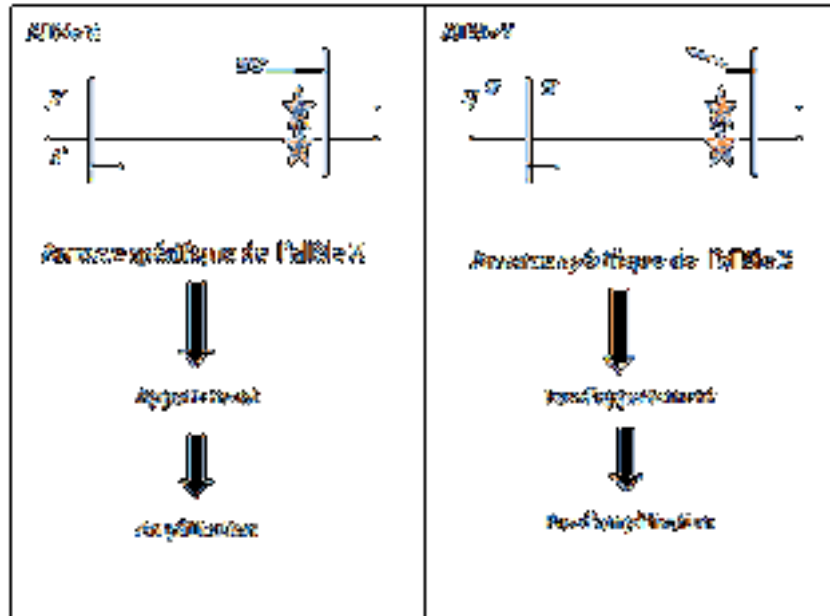
La méthode de typage est basée sur le principe selon lequel une amorce complètement adaptée sera utilisée plus efficacement que dans la réaction PCR à une amorce avec un ou plusieurs mésappariements en particulier dans les premiers cycles critiques.

La PCR SSP consiste à effectuer autant de PCR que d'allèles à identifier dans une même plaque.

Chapitre II : Matériel et Méthodes

Dans chaque puits deux paires d'amorces sont lyophilisées : une pour amplifier l'allèle HLA spécifique testé, et une pour le témoin interne

(A)



(B) Révélation par électrophorèse

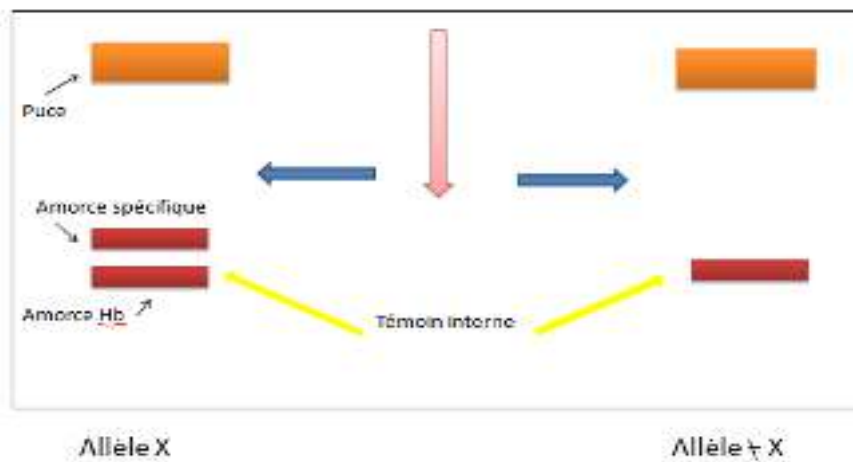


Figure 15 : A, B : principe de la PCR-SSP

Chapitre II : Matériel et Méthodes

II.2.1.4 MODE OPERATOIRE :

*** Préparation de la PCR : (Annexe 03)**

- Préparer les échantillons d'ADN : la concentration doit être 25-200 ng/ μ l (concentration optimale 100 ng / μ l) avec un rapport A260/A280 entre 1.65-1.80.
- Sortir la plaque Micro SSP sélectionnée du congélateur et décongeler à température ambiante (20-25°C) .Replacer immédiatement la partie non utilisée de la plaque à la température de conservation.
- Ajouter 1 μ l de diluant ADN dans le tube de contrôle négatif de la plaque.
- Ajouter la quantité correcte de Taq Polymérase dans le tube de D-MIX et agiter sur vortex .

Pour la quantité voir le tableau suivant :

VOLUME DE D-MIX	VOLUME D'ADN	VOLUME DE TAQ
1000 μ l	111 μ l	5,6 μ l
540 μ l	59 μ l	3,0 μ l
360 μ l	39 μ l	2,0 μ l
270 μ l	29 μ l	1,5 μ l
180 μ l	19 μ l	1,0 μ l

- Boucher le tube, agiter sur vortex et ajouter 10 μ l de D-MIX /Taq au tube contrôle négatif.
- Ajouter la quantité correcte d'ADN (111 μ l pour classe I et 39 μ l pour classe II) dans le tube de D-MIX /Taq et agiter sur vortex Pour la quantité voir le tableau.
- Distribuer 10 μ l de mélange réactionnel (ADN +D-MIX/Taq) dans chaque tube de la plaque SSP sauf le tube contrôle négatif.
- Tapoter légèrement la plaque et vérifier que chaque échantillon soit bien descendu au fond du puits. Couvrir avec la feuille adhésive fournie, mettre la plaque dans le Thermocycleur .Placer le Pressure Pad sur la plaque.

Chapitre II : Matériel et Méthodes

- Démarrer le programme PCR qui dure environ 1 heure et 16 minutes.

*** Préparation du gel d'agarose : (Annexe 04)**

- Ajouter 1 gr d'agarose dans 40 ml de tampon TBE 1x ainsi que 5 μ l de bromure d'éthidium (quantité suffisante pour 3 gels)
- Chauffer (4 minutes) jusqu'à l'obtention d'une solution homogène
- Ajuster le niveau de la base à l'aide des 3 pieds à hauteur réglable.
- Couler 30 ml de gel dans la boîte. S'assurer que le gel recouvre toute la surface de manière uniforme en la faisant osciller par un mouvement de va et vient. Placer rapidement le portoir de peigne.
- Laisser refroidir 15 minutes. Retirer le portoir du peigne en maintenant la plate-forme.
- Ajouter 10 ml de tampon TBE 1x avec 0,5 μ g/ml de bromure d'éthidium. de manière uniforme pour remplir tous les puits.

***Electrophorèse sur gel Post-PCR : (Annexe 05)**

- Transférer chaque réaction PCR (10 μ l) avec pipette à 8 multicanaux.
- Laver 3-4 fois entre les lignes.
- Placer les électrodes sur la boîte de gel et faire migrer les échantillons à 150 volts pendant environ 3,5 minutes jusqu'à ce que le front de migration rouge atteigne 0,5 cm.
- Retirer la boîte de gel et transférer sur un Transilluminateur à UV.
- Photographier le gel complet. (voir Figure 16)
- Analyser les résultats.

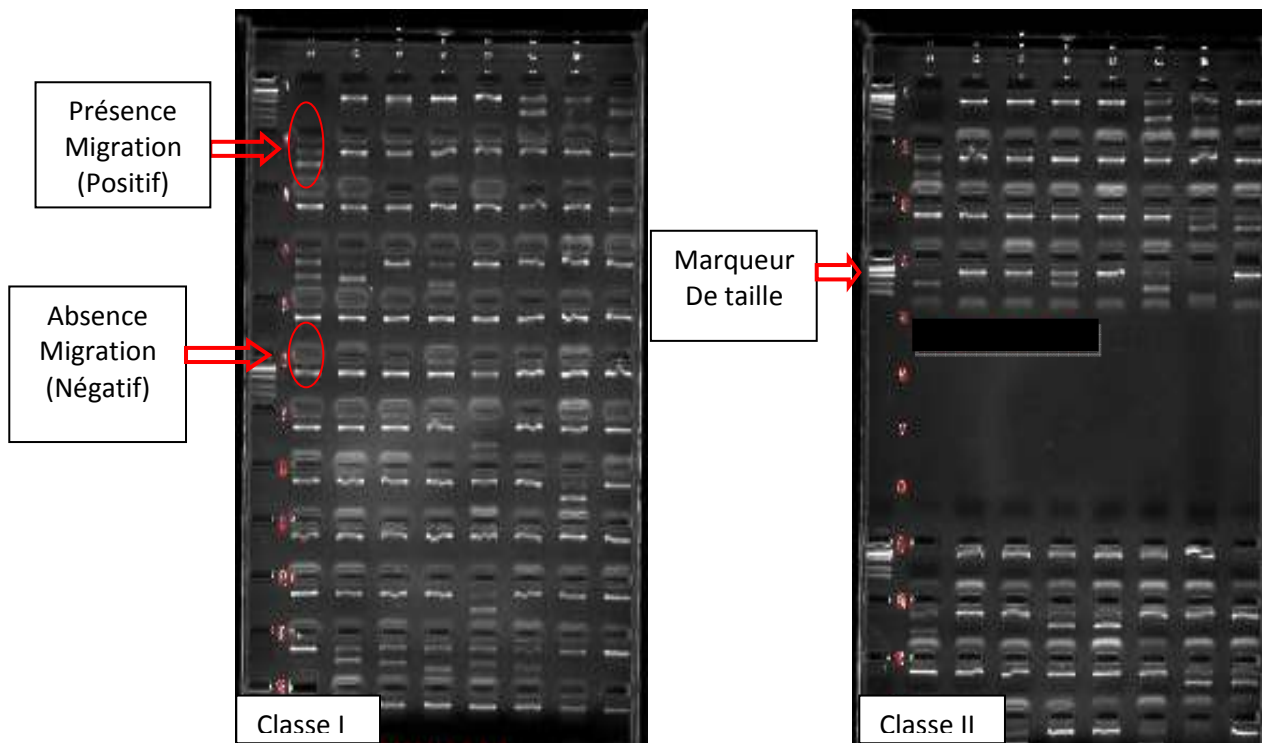


Figure 16 : Contrôle de la PCR-SSP sur gel d'agarose en classe I et II

II.2.3 Etude Statistique :

L'analyse statistique des données s'est déroulée selon les modalités suivantes :

- Confection de tabulation et graphes
- Nous avons utilisé l'Excel pour préparé les tables descriptives
- Les résultats ont été présentés sous forme de graphes (histogramme et diagramme en barre)
- Les Logiciels utilisé pour cette analyse sont : IBM SPSS statistics 20 et logiciel COMPARE.

Chapitre III : Résultats et Discussion

III.1 Résultats :

III.1.1 Etude Cas/Témoin :

III.1.1.1 Caractéristique phénotypiques de la population étudiée :

Une étude cas/témoin a été réalisée sur 110 sujets de tous âges, des deux sexes, non apparentés et comprenant :

- 53 sujets témoins (Donneurs)
- 57 patients présentant une insuffisance rénale chronique terminale (Receveurs)

Tableau IV : Les caractéristiques générales des patients et des sujets témoins

Caractéristique	Témoins (N=53)	Patients (N=57)
Age (Moyenne ± SD)	46.13 ans ± 12.09	37.6 ans ± 12.30
Sexe Masculin	22 (58%)	33 (58%)
Sexe Féminin	31 (42%)	24 (42%)
Sex ratio	1.40	1.37

III.1.1.2 Comparaison entre Allèle HLA de classe I et II des patients avec ceux des témoins :

Tableau V : Fréquence des allèle HLA A chez les patients IRCT et les témoins

Allèle HLA de classe I	MIRCT (N=57)			Témoins (n=53)
HLA A	2N= 114 n(%)	P	OR	2N=106 n(%)
A*01	14(12.28)	0.24	1.72	8 (7.55)
A*02	21 (18.4)	0.34	0.73	25 (23.5)
A*03	3 (2.68)	0.056	0.29	9 (8.49)
A*11	7 (6.14)	0.23	2.25	3 (2.83)
A*23	4 (3.51)	0.44	0.61	6 (5.66)
A*24	14(12.28)	0.49	1.34	10 (9.43)
A*25	2 (1.75)	0.94	0.93	2 (1.89)
A*26	2 (1.75)	0.59	0.61	3 (2.83)
A*29	8 (7.02)	0.29	1.92	4 (3.77)
A*30	11 (9.65)	0.21	0.60	16 (15.09)
A*31	2 (1.75)	0.17	infinity	0 (00)
A*32	6 (5.26)	0.85	1.12	5 (4.72)
A*33	5 (4.39)	0.46	0.65	7 (6.6)
A*34	0 (00)	0.29	00	1(0.94)
A*66	1 (0.88)	0.33	infinity	0 (00)
A*68	11 (9.65)	0.32	1.70	6 (5.66)
A*69	1 (0.88)	0.33	infinity	0 (00)
A*74	0 (00)	0.29	00	1(0.94)
A*80	2 (1.75)	0.17	infinity	0 (00)

Chapitre III :Résultats et Discussion

L'analyse allélique du polymorphisme HLA-A de classe I, montre une fréquence élevée de l'allèle HLA-A*11 chez les malades par rapport aux témoins mais sans différence significative avec comme valeurs respectives : (6.14% vs 2.83% , OR=2.25 ,P=0.23), Cependant la fréquence de allèle HLA-A*03 est plus élevé chez les témoins par rapport aux malades avec une différence presque significative selon les valeurs suivantes : (2.68% vs 8.49% , OR=0.29 , P=0.056).

Tableau VI : Fréquences des allèles HLA B chez les patients IRCT et les témoins

Allèle HLA de classe I	MIRCT (N=57)			Témoins (n=53)
HLA B	2N= 114 n(%)	p	OR	2N=106 n(%)
B*07	8 (7.02)	0.90	1.07	7 (6.60)
B*08	3 (2.63)	0.71	1.41	2 (1.89)
B*13	0 (00)	0.14	00	2 (1.89)
B*14	13 (11.4)	0.23	2.09	6 (5.66)
B*15	5 (4.39)	1	0.93	5 (4.72)
B*18	4 (3.51)	0.18	0.45	8 (7.55)
B*27	3 (2.63)	0.63	0.69	4 (3.77)
B*35	5 (4.39)	0.46	0.65	7 (6.60)
B*38	2 (1.75)	0.94	0.93	2 (1.89)
B*39	5 (4.39)	0.084	infinity	0 (00)
B*40	0 (00)	0.07	00	3 (2.83)
B*41	1 (0.88)	0.33	infinity	0 (00)
B*42	1 (0.88)	0.95	0.93	1 (0.94)
B*44	15 (13.16)	0.26	1.63	9 (8.49)
B*45	8 (7.02)	1.07	0.90	7 (6.60)
B*47	1 (0.88)	0.33	infinity	0 (00)
B*49	5 (4.39)	0.32	0.56	8 (7.55)
B*50	9 (7.89)	0.87	0.92	9 (8.49)
B*51	12 (10.53)	0.85	0.92	12 (11.32)
B*52	6 (5.26)	0.85	1.12	5 (4.72)
B*53	1 (0.88)	0.51	0.46	2 (1.89)
B*55	1 (0.88)	0.95	0.93	1 (0.94)
B*57	3 (2.63)	0.92	0.93	3 (2.83)
B*58	2 (1.75)	0.59	0.61	3 (2.83)
B*78	1 (0.88)	0.33	infinity	0 (00)

L'analyse allélique du polymorphisme HLA-B de classe I, montre une fréquence élevé de l'allèle HLA-B*14 chez les malades par rapport aux témoins mais sans différence significative avec comme valeur respective : (11.4% vs 5.66%, OR=2.09, P=0.23).

Chapitre III : Résultats et Discussion

Cependant la fréquence de l'allèle HLA-B*18 est plus élevée chez les témoins par rapport aux malades sans vraiment une différence significative d'après les valeurs suivantes : (3.51% vs 7.55%, OR=0.45, P=0.18).

Tableau VII: Fréquences des allèles HLA C chez les patients IRCT et les témoins

Allèle HLA de classe I	MIRCT (N=57)			Témoins (n=53)
HLA C	2N= 114 n(%)	P	OR	2N=106 n(%)
C*01	4 (3.51)	0.20	3.82	1 (0.94)
C*02	7 (6.14)	0.88	1.09	6 (5.66)
C*03	2 (1.75)	0.35	0.46	4 (3.77)
C*04	8 (7.02)	0.51	0.72	10 (9.43)
C*05	11 (9.65)	0.26	1.78	6 (5.66)
C*06	14 (12.28)	0.68	0.85	15 (14.15)
C*07	21 (18.42)	0.20	0.66	27 (25.47)
C*08	13 (11.4)	0.21	1.82	7 (6.6)
C*12	10 (8.77)	0.94	1.04	9 (8.49)
C*14	1 (0.88)	0.08	0.18	5 (4.72)
C*15	10 (8.77)	0.12	2.45	4 (3.77)
C*16	11 (9.65)	0.95	1.03	10 (9.43)
C*17	2 (1.75)	0.94	0.93	2 (1.89)

L'analyse allélique du polymorphisme HLA-C de classe I, montre une fréquence élevée de l'allèle HLA-C*15 chez les malades par rapport aux témoins mais sans différence significative avec comme valeur respective : (8.77% vs 3.77% , OR=2.45 ,P=0.12), Cependant la fréquence de l'allèle HLA-C*07 est plus élevée chez les témoins par rapport aux malades sans une différence significative selon les valeurs suivantes : (18.42% vs 25.47% , OR=0.66 , P=0.20).

Chapitre III : Résultats et Discussion

Tableau VIII : Fréquences des allèles HLA DRB1* chez les patients IRCT et les témoins

Allèle HLA de classe II	MIRCT (N=57)			Témoins (n=53)
HLA DR	2N= 114 n(%)	P	OR	2N=106 n(%)
DRB1*01	4 (3.51)	0.07	0.35	10 (9.43)
DRB1*03	11 (9.65)	0.21	0.60	16 (15.09)
DRB1*04	27 (23.68)	0.21	1.52	18 (16.98)
DRB1*07	16 (14.04)	0.98	0.99	15 (14.15)
DRB1*08	4 (3.51)	0.46	1.89	2 (1.89)
DRB1*09	2 (1.75)	0.17	infinity	0 (00)
DRB1*10	1 (0.88)	0.33	infinity	0 (00)
DRB1*11	16 (14.04)	0.84	1.14	13 (12.26)
DRB1*12	0 (00)	0.29	00	1(0.94)
DRB1*13	12 (10.53)	0.68	0.84	14 (13.2)
DRB1*14	1 (0.88)	0.51	0.46	2 (1.89)
DRB1*15	18 (15.79)	0.33	1.47	12 (11.32)
DRB1*16	2 (1.75)	0.59	0.61	3 (2.83)

L'analyse allélique du polymorphisme HLA-DRB1, montre une fréquence élevée de l'allèle HLA-DRB1*04 chez les malades par rapport aux témoins mais sans différence significative avec comme valeur respective : (23.68% vs 16.98%, OR=1.52 ,P=0.21), Cependant la fréquence de l'allèle HLA-DRB1*01 est plus élevée chez les témoins par rapport aux malades presque une différence significative selon les valeurs suivantes : (3.51% vs 9.43% , OR=0.35 , P=0.07).

Tableau IV : Fréquences des allèles HLA DQB1* chez les patients IRCT et les témoins

Allèle HLA de classe II	MIRCT (N=57)			Témoins (n=53)
HLA DQ	2N= 114 n(%)	P	OR	2N=106 n(%)
DQB1*02	32 (28.07)	0.77	1.10	27 (25.47)
DQB1*03	42 (36.84)	0.68	1.14	33 (31.15)
DQB1*04	5 (4.39)	0.90	0.93	5 (4.72)
DQB1*05	10 (8.77)	0.21	0.58	16 (15.09)
DQB1*06	25 (21.93)	0.87	0.93	25 (23.5)

L'analyse allélique du polymorphisme HLA-DQB1 de classe II, montre une fréquence élevée de l'allèle HLA-DQB1*03 chez les malades par rapport aux témoins

Chapitre III :Résultats et Discussion

mais sans différence significative avec comme valeur respective : (36.84% vs 31.15%, OR=1.14 ,P=0.68), Cependant la fréquence de l'allèle HLA-DQB1*05 est plus élevée chez les témoins par rapport aux malades sans vraiment une différence significative selon les valeurs suivantes : (8.77% vs 15.09% , OR=0.58 , P=0.21).

A l'issue de notre étude cas/témoin nous avons trouvé qu'il n'y pas d'association entre allèle HLA et la Maladie étudiée.

III.1.2 Etude des fréquences alléliques HLA :

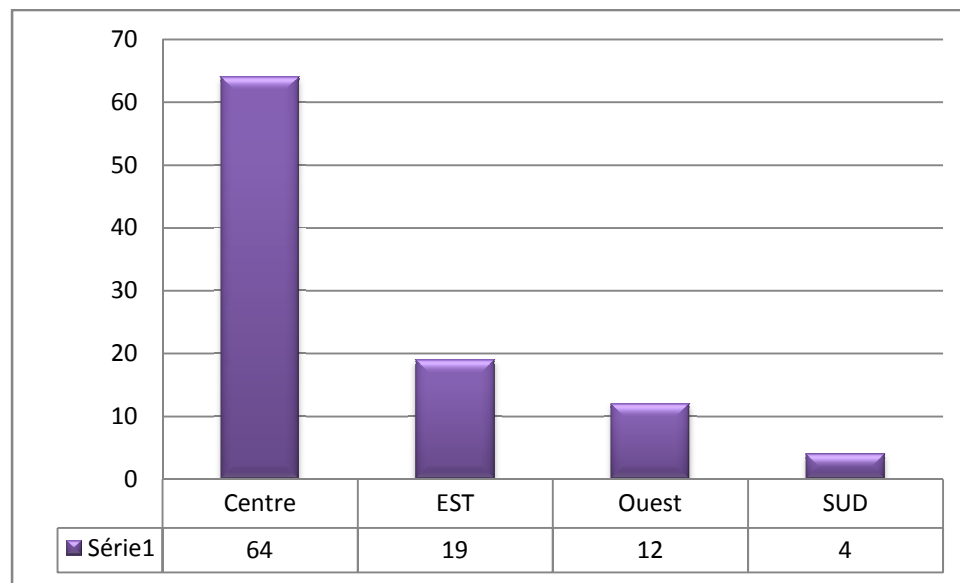
III.1.2 .1 Les caractéristiques phénotypiques de la population étudiée :

Nous avons réalisé cette étude rétro-prospective sur 99 sujets sains.

Tableau X : Les caractéristiques générales des sujets sains

Caractéristiques	Les sujets sains (N=99)
Age (moyenne \pm SD)	44.43 ans \pm 12.46
Sexe masculin	43 (43%)
Sexe féminin	56 (57%)
Sexe ratio	1.30

Figure 19 : la répartition des sujets selon les régions géographiques



Chapitre III : Résultats et Discussion

III.1.2.1.1 HLA-A :

On a noté la présence de 18 spécificités génériques HLA-A au sein de notre population étudiée. En effet les allèles HLA-A*02 ,A*30 ,A*01 ,A*68,A*24 sont les plus représentés avec des fréquences de 22.7%, 12.1%, 9.6%, 9.6%,9.6% respectivement, les allèles A*66 , A*74 , A*80 sont très faiblement représentés. La figure 20 montre cette répartition.

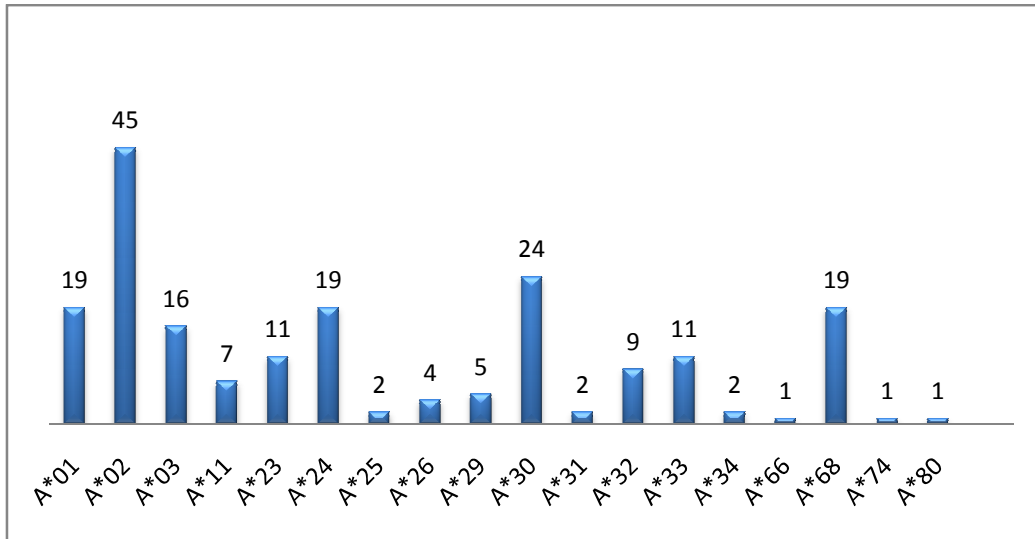


Figure 20 : Graphe des fréquences des allèles HLA-A.

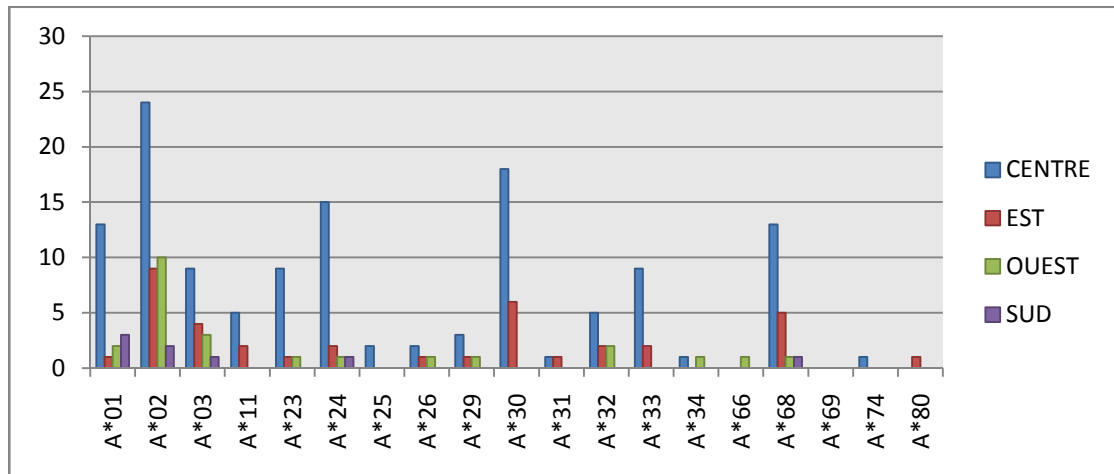


Figure 21 : Distribution des allèles HLA-A selon les régions géographiques.

Par ailleurs, si l'on examine la distribution de ces allèles selon les régions géographiques, on constate que :

- L'allèle HLA-A*02 est le plus fréquent, quelle que soit la région géographique du pays.

Chapitre III : Résultats et Discussion

- Les allèles A*30 et A*24 sont les plus fréquents dans la région du centre, en comparaison avec les autres régions.
- L'allèle HLA-A*03 est fréquent dans la région ouest, HLA A*30 pour la région Est et le A*01 pour la région Sud.

III.1.2.1.2 HLA-B :

Parmi les 23 spécificités HLA-B présents dans notre population, les plus fréquemment représentés sont B*44, B*50, B*51, B*15 avec des fréquences respectives de 11.6%, 9.6%, 9.6%, 7.1%. Par contre la fréquence des allèles HLA-B*39, B*41, B*55 sont très faiblement présents.

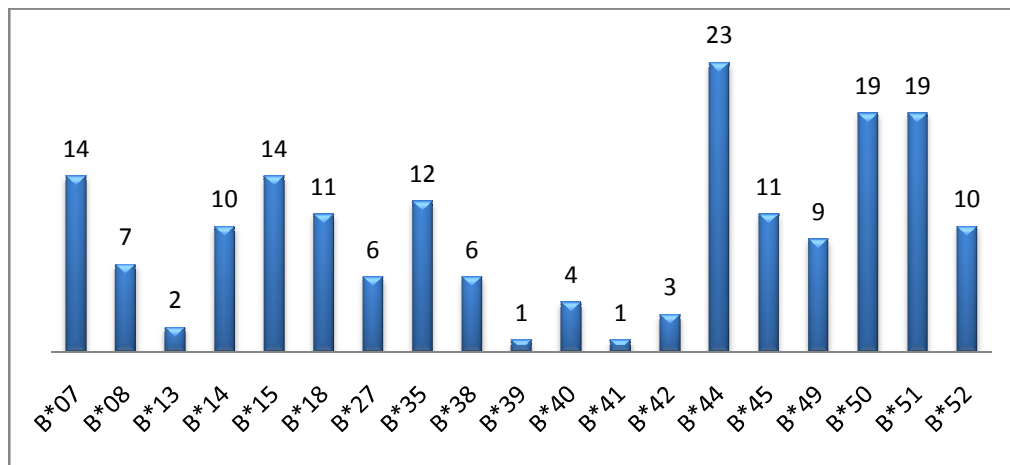


Figure 22 : Graphe des fréquences des allèles HLA-B.

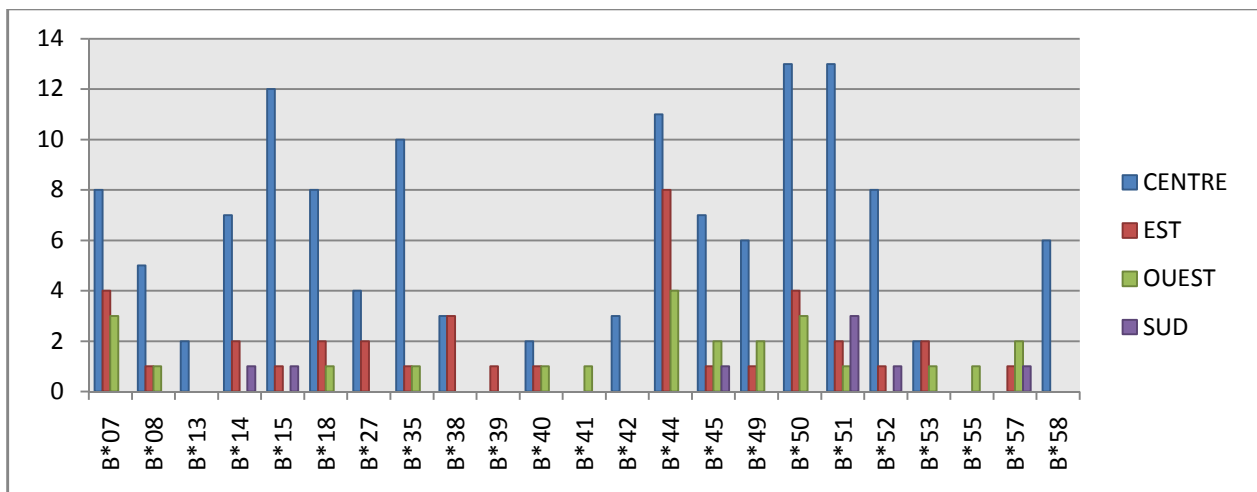


Figure 23 : Distribution des allèles HLA-B selon les régions géographiques.

Chapitre III : Résultats et Discussion

L'analyse de la répartition de ces allèles HLA-B selon les régions géographique montre :

- L'allèle B*44 est le plus retrouvé chez les régions Est et Ouest,
- pour la région centre la forte représentation est partagé entre les allèles B*50 et B*51 et pour le Sud l'allèle B*51 est le plus retrouvé.

III.1.2.1.3 HLA-C :

On a noté la présence de 13 spécificités génériques HLA-C au sein de notre population étudiée. En effet les allèles les plus représentés sont HLA -C*07, C*06 et le C*04 selon les fréquences respectives 23.2%, 11.6% et 11.1%.

Quand à la distribution des allèles HLA-C selon les régions, On constate le C*15 plus présent dans la région du Sud comparé a celle de l'Est et l'ouest, et le C*06 plus fréquent dans la population de l'Est par apport à l'ouest.

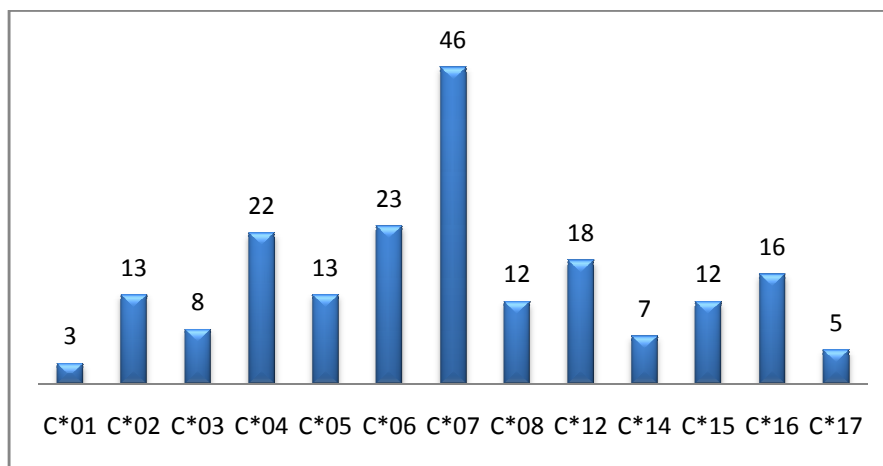


Figure 24 : Graphe des fréquences des allèles HLA-C.

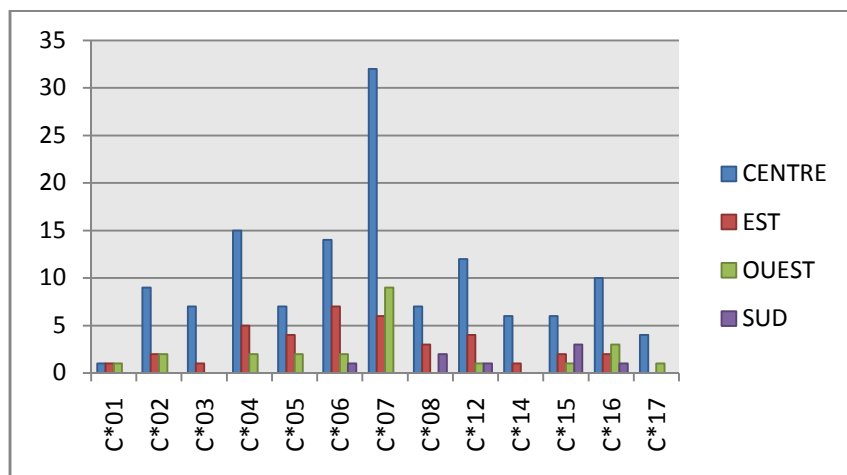


Figure 25 : Distribution des allèles HLA-C selon les régions géographiques.

III.1.2.1.4 DRB1 et DQB1

L'analyse de la distribution des Allèles DRB1 et DQB1 de la classe II montre 12 allèles DRB1 les plus fréquents dans cette population sont le DRB1*04 et DRB1*03 avec comme valeurs 17.2% et 14.1% et un faible pourcentage de 0.5% pour le DRB1*12 (voir Figure 26). Pour l'allèle DQB1 qui est faiblement polymorphe avec 5 allèles les plus fréquents sont DQ*03 et le DQ*02 avec 25.2% et 30.3%(voir Figure 27).

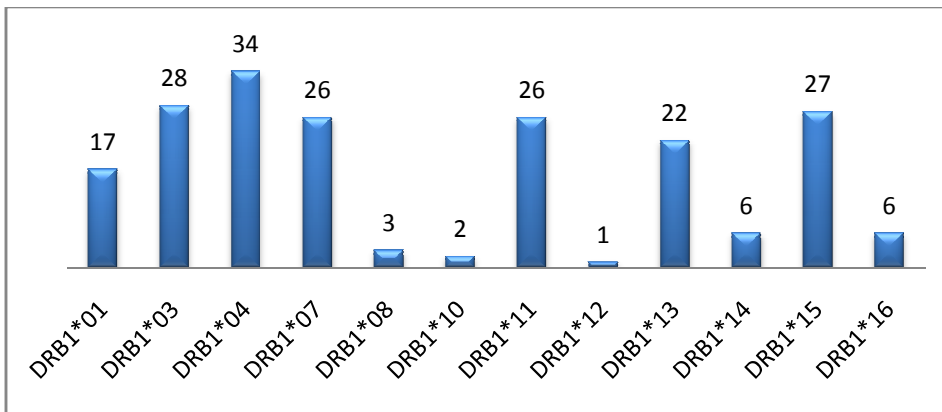


Figure 26 : Graphe des fréquences des allèles HLA-DRB1.

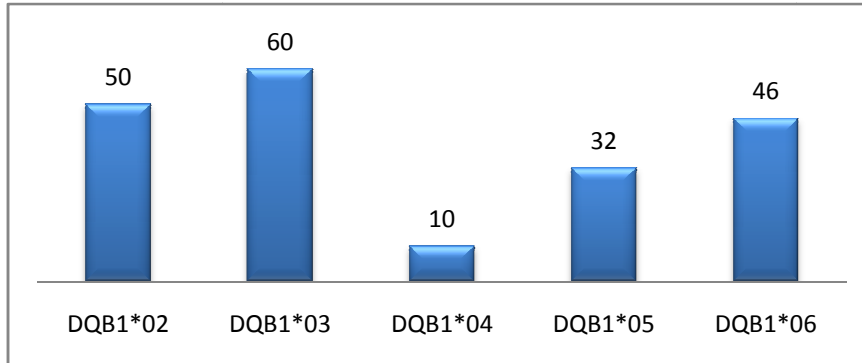


Figure 27 : Graphe des fréquences des allèles HLA-DQB1.

Pour la répartition géographique chez l'allèle DR, on retrouve les allèles DRB1*03, DRB1*15 et DRB1*11 plus fréquents dans le centre, le DRB1*04 fréquent dans le centre ainsi que l'EST et l'Ouest et pour la région du Sud il y'a présence de l'allèle DRB1*11,13 et 15.

Pour l'allèle DQB1, il y a une grande fréquence dans le centre de tous les allèles, pour l'Est et l'Ouest DQB1*03 pour le Sud c'est le DQB1*06.

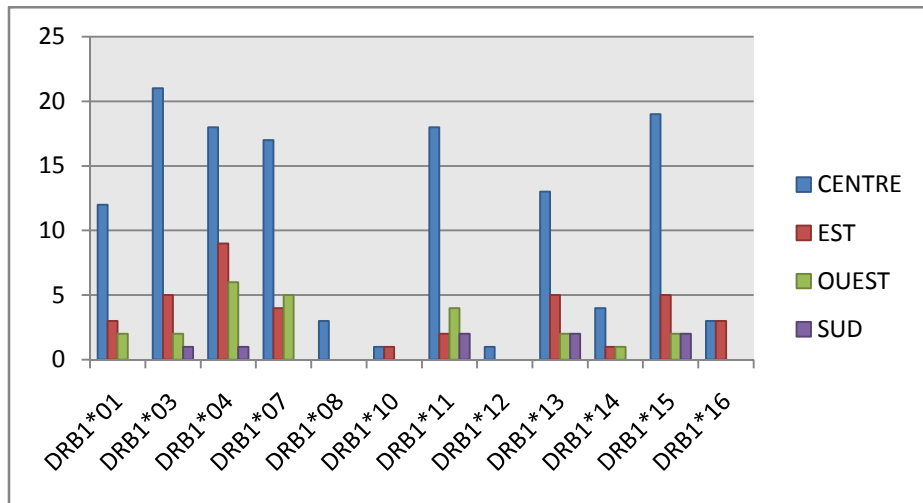


Figure 28 : Distribution des allèles HLA-DRB1 selon les régions géographiques.

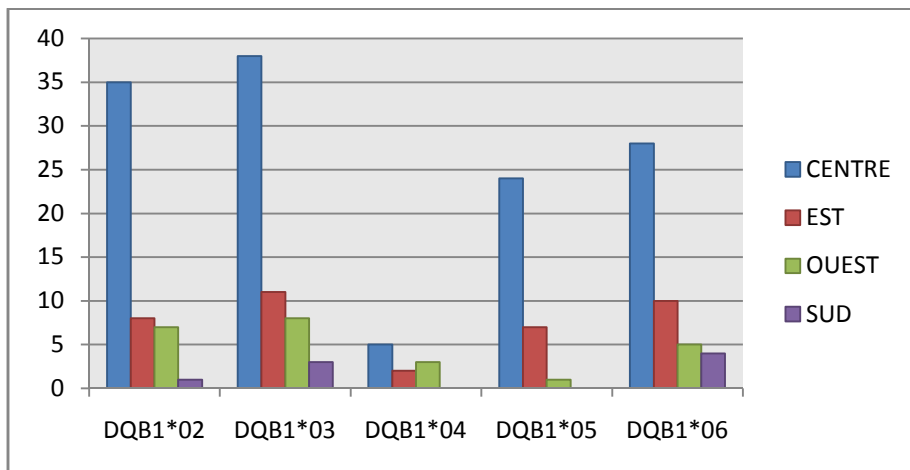


Figure 29 : Distribution des allèles HLA-DQB1 selon les régions géographiques.

III.1.3 Etude des fréquences haplotypiques :

En ce qui concerne l'étude des haplotypes, nous avons pu exploiter 34 dossiers dont le lien de parenté entre le couples D/R est semi-identique (soit par lien de fraternité ou bien parents/enfants) parmi les 110, c'est l'équivalent d'une étude des fréquences haplotypiques de 34 familles, sachant qu'on peut déduire 4 haplotypes de chaque famille, nous avons pris 3 haplotypes pour chaque dossier en éliminant l'haplotype commun entre D/R, ce qui donne 102 haplotypes à étudier.

Les résultats obtenus des haplotype les plus fréquents se trouvent dans le tableau XI :

Chapitre III : Résultats et Discussion

Tableau XI : Fréquences haplotypiques chez la population Algérienne.

Haplo type							
A-B-C		A-B		A-C		DR-DQ	
A01B49C07	2(1.9%)	A01B49	2(1.9%)	A01C07	6(5.88%)	DR01DQ05	6(5.88%)
A02B07C07	3(2.94%)	A02B07	3(2.94%)	A02C02	2(1.9%)	DR03DQ02	7(6.86%)
A02B45C16	3(2.94%)	A02B18	2(1.9%)	A02C05	2(1.9%)	DR03DQ04	3(2.94%)
A02B50C06	4(3.92%)	A02B45	4(3.92%)	A02C06	5(4.90%)	DR04DQ03	8(7.84%)
A24B35C04	2(5.9%)	A02B50	4(3.92%)	A02C07	4(3.92%)	DR04DQ04	2(1.9%)
A30B42C17	2(5.9%)	A01B51	2(1.9%)	A02C12	3(2.94%)	DR07DQ02	10(9.80%)
A33B14C08	3(2.94%)	A02B51	3(2.94%)	A02C16	4(3.92%)	DR07DQ03	2(1.9%)
A68B65C08	2(1.9%)	A02B44	2(1.9%)	A03C12	2(1.9%)	DR11DQ03	4(3.92%)
A68B49C07	2(1.9%)	A24B18	2(1.9%)	A24C02	2(1.9%)	DR11DQ05	4(3.92%)
A68B53C04	2(1.9%)	A24B35	2(1.9%)	A24C04	2(1.9%)	DR13DQ03	2(1.9%)
A68B14C08	2(1.9%)	A24B38	2(1.9%)	A11C07	3(2.94%)	DR13DQ06	6(5.88%)
-	-	A30B42	2(1.9%)	A30C05	2(1.9%)	DR15DQ06	12(11.76)
-	-	A30B44	3(2.94%)	A30C04	2(1.9%)	DR16DQ05	3(2.94%)
-	-	A33B14	2(1.9%)	A30C17	4(3.92%)	-	-
-	-	A68B15	2(1.9%)	A32C02	2(1.9%)	-	-
-	-	A68B45	2(1.9%)	A33C08	2(1.9%)	-	-
-	-	A68B49	2(1.9%)	A68C04	2(1.9%)	-	-
-	-	A68B53	2(1.9%)	A68C07	3(2.94%)	-	-
-	-	A68B65	2(1.9%)	A68C08	2(1.9%)	-	-

Les haplotypes les plus fréquemment retrouvés sont :

- Association A-B-C : A02B50C06(3.92%),A02B45C16 / A02B07C07 et A33B14C08 (2.94%) .
- Association A-B : A02B45/A02B50(3.92%) , A02B07/A02B51/A30B44 (2.94%) .
- Association A-C : A01C07 (5.88%), A02C06(4.90%) A30C17/A02C16(3.92%) .

III-2 Discussion :

III.2.1 Etude cas/témoins :

Dans notre étude cas/témoins , nous avons pris un échantillon de 53 témoins et 57 patients ayant une insuffisance rénale chronique terminale. La comparaison des allèles HLA entre ces deux populations qui n'ont aucun lien de parenté a révélé qu'il n'existe pas d'association entre les allèles HLA et la maladie étudiée.

Cependant, l'insuffisance rénale chronique est la conséquence d'une maladie sous-jacente d'où la multitude d'étiologies à savoir : le diabète, HTA, Lupus....etc.

III.2.2 Etude des fréquences alléliques :

Dans la deuxième partie nous avons étudié les fréquences des allèles HLA d'une population de 99 sujets algériens sains provenant majoritairement de la région Centre, nous avons comparé aussi notre étude avec celles des pays voisins et d'autres études internationales .

Plusieurs études concernant la description des allèles HLA dans la population Algérienne ont été faite à ce jour mais elles ont concerné pour la plupart que la classe II (HLA DR-DQ).quelques unes ont abordé les allèles HLA de classe I (HLA-A, B et C), mais sur des échantillons restreints. (Amroun H *et al*, 2010)

Les résultats obtenus montrent une grande variabilité génétique avec 18 allèles pour le locus HLA-A sur 22 allèles existants dans le monde, 23 allèles pour le locus HLA-B sur 31, 13 allèles pour le locus HLA-C sur 14, 12 allèles pour le locus DRB1 sur 13 et 5 allèles pour le locus DQB1 sur 5.

Pratiquement la majorité des allèles HLA sont présents dans notre population, mise à part quelques allèles propre à des populations minoritaires, Asiatiques ou d'Afriques noir. Les allèles HLA-A*36, A*43, A*23 caractérisant les populations africaines sont absents dans notre population, par ailleurs HLA-A*25 qui semble être un allèle caractéristique des populations européennes d'après Amroun H et al, 2010 est rarement présenté dans notre population ainsi que pour HLA-A*31(Amérique latine) et A*34 (Asiatique : Malaisie, Philipine). Pour les allèles HLA-B*37, B*46, B*48/B*54, B*56, B*59 retrouvé que dans les pays Asiatique (Inde, Vietnam, Taiwan, Coré du sud, Japon .respectivement) sont absents dans notre population ainsi que pour HLA-B*81 présent dans l'Afrique noire. Le seul allèle HLA-C manquant est

Chapitre III : Résultats et Discussion

le C*18 qui appartient à l'Afrique centrale et pour HLA-DR c'est le DRB1*09 qui caractérise la population Asiatique selon le site (allele*frequencies). Ces résultats expliquent qu'il n'y avait pas de brassage entre notre population et celles asiatiques (Chine, Japon, Vietnam) et d'Afrique Noire (pays du Centre et du Sud africain)

La comparaison de nos résultats avec ceux d'une autre population Algérienne (Amroun H *et al*, 2010) et ceux des pays suivants : la Tunisie, le Maroc, la Turquie, l'Espagne et la France, sont représentés dans le tableau XII.

Tableau XII : Comparaison des fréquences HLA de cette population avec ceux de d'autres pays

Allele	Algérie (Amroun H <i>et al</i> , 2010)	Tunisie (Retima A <i>et al</i> , 2015)	Maroc (Arnaiz-Villena A <i>et al</i> , 1995)	Turquie (Kocak <i>et al</i> , 2008)	France (Lorenz <i>et al</i> , 2000)	Espagne (Arnaiz-Villena A <i>et al</i> , 1995)	Autres
A*02	0.45	0.42	0.48	0.41	0.43	0.44	0.46
A*03	0.15	0.18	0.12	0.14	0.16	0.13	0.17
A*23	0.05	0.04	0.06	0.03	0.05	0.04	0.05
A*24	0.02	0.01	0.03	0.02	0.01	0.02	0.01
A*26	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*30	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*31	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*32	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*33	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*34	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*35	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*36	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*37	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*38	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*39	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*40	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*41	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*42	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*43	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*44	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*45	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*46	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*47	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*48	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*49	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*50	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*51	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*52	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*53	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*54	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*55	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*56	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*57	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*58	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*59	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*60	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*61	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*62	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*63	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*64	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*65	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*66	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*67	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*68	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*69	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*70	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*71	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*72	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*73	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*74	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*75	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*76	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*77	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*78	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*79	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*80	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*81	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*82	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*83	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*84	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*85	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*86	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*87	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*88	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*89	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*90	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*91	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*92	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*93	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*94	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*95	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*96	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*97	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*98	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*99	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
A*100	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

Les résultats de notre étude s'avèrent être presque les mêmes que ceux apportés par des études algériennes antérieures (Amroun H *et al*, 2010), (Arnaiz-Villena A *et al*, 1995), (Retima A *et al*, 2015). Nous constatons aussi que nos résultats sont très proches des fréquences tunisiennes et marocaines ainsi que d'autres populations caucasiennes.

Ce tableau confirme la prédominance de l'allèle A*02 dans les populations maghrébines ainsi que d'autres populations du globe. Concernant le locus B qui est le plus polymorphe parmi tous les allèles HLA, l'allèle B*44 est le plus fréquent dans la

Chapitre III :Résultats et Discussion

population algériennes comme pour les populations maghrébines, on partage aussi cette prédominance de B*44 avec les populations européenne.

Le locus HLA-C présente une fréquence élevée pour l'allèle C*07 et C*06 chez notre population comme dans les autres populations. (Retima A *et al*, 2015) ,(Ayed.K *et al*, 2004).

D'après les diagrammes de répartition des allèles HLA selon les quatre régions géographique d'Algérie, on constate que les allèles les plus sont aussi présents d'une façon prédominante chez la population du centre Algérien, cela est du à l'emplacement géographique du centre recruteur (CHU Blida).

III.2.3 Etude des fréquences haplotypiques :

Nous avons pu déduire les haplotypes de 34 dossiers qui sont l'équivalent d'une étude de 34 familles, ce qui fait 102 haplotypes au total. Les plus fréquemment observés sont représenté dans le tableau XIII.

Tableau XIII : Haplotypes en commun avec d'autres populations

Haplotypes		Les haplotypes en commun dans d'autres populations (allele*frequencies)
A-B-C	Fréquence	
A02B50C06	4(3.92%)	Maroc settat chaouya : 3.60%(n=98) , Tunisie :3% n=100 ;Maroc Côte Atlantique chaouya :2.90% n=98 .
A02B07C07	3(2.94%)	USA population caucasienne :3.30% n=265 , Afrique de sud caucasien :2.22% n =102 , Espagne :2.20 % n =90.
A02B45C16	3(2.94%)	Mali :3.50% n=138 , USA Américain Africain :1.40% n=252 , Afrique de sud noire :1.11%(200) .
A33B14C08	3(2.94%)	Tunisie : 4%(n=100) , Italie Sedaine :3% n=100 , Espagne : 2.60 % n=88
A-B	Fréquence	
A02B45	4(3.92%)	Mali : 3.50%(n=138) et Cuba : 3.60%(n=42), USA américain africain :1.80% n=252 , Maroc :1.59% n =110.
A02B50	4(3.92%)	Lybie : 4.24% (n=118), Maroc 3.6%(n=98) , Tunisie 3% (n=100)
A02B07	3(2.94%)	Espagne Pas Valley :3.80%(n=88) , Maroc :1.59%(n=110) , Tunisia :1.57%(n=95) ,USA population caucasienne :3.40% n=265
A02B51	3(2.94%)	Oman :5.6%(n=115) , Tunisie :4.5%(n=100)
A30B44	3(2.94%)	Maroc :1.36%(n=110) ,Tunisie :1.20%(n=104) , Brésil Paraná Afro Brésilien :1.30 (n=77)

Chapitre III :Résultats et Discussion

A-C	Fréquence	
A01C07	6(5.88%)	Espagne :6.10%(n=88) , USA population caucasienne :7% (n=265) , Afrique de sud caucasiens :8.89% (n=102)
A02C06	5(4.90%)	Maroc settat chaouya :3.6%n=98 , Tunisie 3% n=100 .
A02C07	4(3.92%)	USA population caucasienne 3.30 n =265 , Afrique de sud caucasiens :2.22 % n=102
A02C16	4(3.92%)	Tunisie :3% n=100 , Mali :3.50% n=138, Espagne :3.5% n=88 .
A30C17	4(3.92%)	Maroc settat chaouya :2.90%(n=98) ,Mali :10.40% n=138 , Afrique de sud noire :3 n=200
DRB1-DQB1	Fréquence	
DR15DQ06	12(11.76%)	Tunisia Matmata Berber :12% n=81 , Maroc settat chaouya :8.90%(n=98) Tunisia Gabes Arab:7.20 n=96
DR07DQ02	10(9.8%)	Israël Juifs libyens :24.7 %n=119 , Israël Juifs yéménites :22.10% n=76 , Israel Marocains Juifs :18.8% n=113 , Tunisia Matmata Berber :17% n=81
DR04DQ03	8(7.8%)	Tunisie :11% n=111 , Maroc: 6.71% n =110 , USA Caucasians 14.20% n=220

Le tableau XII montre les haplotype en commun avec les autres populations , nos résultats sont très proches à ceux retrouvé par nos voisins le Maroc et la Tunisie . on remarque aussi la liaison de notre pays avec les populations caucasiennes surtout ibérique (Espagne, Portugal) et Africaines de l'Afrique subsaharienne :

- Les haplotypes A02B50C06 ainsi que A02B50 et A02C06 sont des haplotypes propre à la population du grand Maghreb (Nord Africain)
- Les Haplotypes A02B07C07 ainsi que A02B07 et A02C07 sont des haplotypes qui caractérisent les populations caucasiennes.
- Les Haplotypes A02B45C16 ainsi que A02B45 et A02C16 et même A30C17 sont des haplotypes Africains

Concernant les associations DRB1/DQB1 nous remarquons la prédominance de : DR15DQ06 , DR07DQ02 , DR04DQ03 chez les populations du Nord Africain, cela est expliqué par l'origine Berbère de ces associations.

Cette diversité des ethnies dans la région de l'Afrique du Nord est expliquée par les nombreuses incursions de populations, telles que les Phéniciens, Romains, Arabes, Turques et européens, en plus des populations natal original. (A. Hajjej *et al*, 2005)

CONCLUSION

Notre travail porté sur une population d'insuffisants rénaux chronique terminal en attente de transplantation ainsi que leurs donneurs potentiels.

Le typage d'un individu est considéré comme un critère diagnostique moléculaire important, Depuis l'avènement de la technique de PCR, la diversité génétique a été étudiée au niveau de l'ADN génomique par des techniques de la biologie moléculaire. Nous avons opté pour la PCR-SSP (Séquence Spécifique Primer).

Dans un premier temps, on a fait une étude cas/témoins nous avons comparé les fréquences alléliques de 57 patients avec 53 témoins dans le but de trouver une association entre les allèles HLA et la maladie rénale chronique. Les résultats obtenus étaient négative, nous avons trouvé qu'il n'y avait pas d'association entre les allèles HLA et l'insuffisance rénale chronique, sachant que cette dernière a plusieurs étiologie, cette maladie peut être d'une cause indéterminé, il sera préférable d'élargir la taille des échantillons, de réalisé une étude cas/témoin sur des patients en IRC d'une étiologie indéterminé pour confirmé ou infirmé nos résultats.

Concernant l'étude des fréquences des allèles HLA et les haplotypes nos résultats montrent qu'il existe une grande diversité génétique ce qui explique le lien de notre population avec d'autre ethnies.

Étant donné l'importance de système HLA dans les domaines de la médecine, de l'anthropologie et de la recherche en général, il est nécessaire de s'interrogé sur les contraintes des travaux sur ce domaine on site parmi eux : l'absence de laboratoires HLA accrédités EFI , l'absence de structures de recherche, le coût élevé des examens (infrastructures et réactifs), la difficulté à publier dans des revues indexées lorsque les moyens ne permettent pas toujours d'utiliser des techniques de pointe comme le séquençage.

Si la description de ces polymorphismes moléculaires et géniques est l'objet de performances sans cesse améliorées, c'est aujourd'hui l'impact fonctionnel de ce polymorphisme qui attire toutes les attentions en clinique. Ainsi la transplantation d'organe et plus encore la greffe de CSH (cellules souches hématopoïétiques) se sont développées grâce à une meilleure définition du polymorphisme HLA.

Abstract

The chronic renal insufficiency (CRI) is defined by the progressive and irreversible reduction of glomerular flow of filtration (DFG) which is the best indicator of renal function.

Renal transplantation constitutes a true revolution for the patients reached of a final chronic renal insufficiency (FCRI) and who had for only recourse only dialysis like palliative treatment to life.

HLA system is a set of genes which are expressed in the form of antigens on the surface of the majority of the cells of the organism, it is characterized by its polymorphism dissected thanks to the genetic approaches and of distribution in the population.

Typing HLA consists

in identifying these antigens characteristic of the individual. Some types HLA are often associated with certain diseases, typing is regarded as a criterion of important molecular diagnosis. Since the advent of the technique of PCR, genetic diversity was studied on the level of the DNA genomics by techniques of molecular biology. We chose the PCR-

SSP (Specific Sequence Primer). The objectives of our work are

initially represented by a study pilot cases/witnesses consists

in finding an association of alleles HLA and the chronic kidney disease, then to carry

out a study of the frequency of alleles HLA as well

as the haplotypes in a healthy Algerian population. For that, a retrospective study was conducted to the service of immunology CHU of Blida on 110 files including donors and receivers being spread out over one 6 years period.

The study cases/witnesses revealed negative, we found that there is no association between the alleles HLA and the chronic renal insufficiency.

The most frequent alleles are: A*02 (22.7%), A*30 (12.1%), B*44 (11.6%), B*50/B*51 (9.6%), C*07 (23.2%), C*06 (11.6%), DRB1*04 (17.2%), DRB1*03 (14.1%), DQB1*03 (30.3%), DQB1*02 (24.7%).

The haplotypes most frequently found are:

- Association ABC: A02B50C06, A02B45C16, A02B07C07 and A33B14C08

- Association A-B: A02B45, A02B50, A02B07, A02B51, A30B44

- Association AC: A01C07, A02C06, A30C17, A02C16

Our results are close to the frequencies Tunisian and Moroccan and other Caucasian populations. **Key words:** FCRI, HLA typing, PCR-SSP, Polymorphism HLA.

ANNEXE 01 :

1.Extraction de l'ADN génomique :

- Extraction Manuel par EZ1 BioRobot de QIAGEN



Les réactifs du Kit QIAGEN



Prélèvement 200µl



EZ1 BioRobot



*Insertion Carte Mémoire
DNA Blood*



Démarrage de L'appareil



L'ADN extrait

ANNEXE 02 :

2.Préparation de la PCR :



Plaque Micro-SSP



Mélange D-mix/Taq



Addition de l'ADN sur le mélange
D-mix/Taq



Répartition de mélange ADN/D-mix/Taq
sur les puits de la plaque



Férmeture de la Plaque



Placement des plaque au
thermocycleur



ANNEXE 03 :

3. Electrophorèse sur gel d'agarose :

- Préparation de gel :



Peser d'agarose



Addition de la solution tamponne



Placement de mélange dans le micro-onde pdt 4 min



Addition de Bromure d'éthidium



Ecoulement du mélange sur la plaque de migration



Placer les empreintes



La Plaque prête pour l'utilisation



Addition de Tampon

ANNEXE 04

- La Migration sur gel :



Transfert de produits
d'amplification dans les puits de
la plaque de migration



La Migration



Lecture sous UV Gel doc



Interprétation des Résultats dans
le Logiciel HLA fusion

Références Bibliographies

A

Andrew S Levey, J. C. (2003). National Kidney Foundation Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification. *Clinical Guidelines* , 138-139.

Amroun H, M. F. (2010). Fréquences allélique et haplotypiques HLA-A,- B, -Cw dans la population algérienne. *SAI* , 52-56.

A. Hajjej, S. H. (2005). HLA genes in Southern Tunisians (Ghannouch area) and their Relationship with other Mediterraneans. *Elsevier SAS* , 44-56.

Agence de biomedecine (2014). INSUFFISANCE RÉNALE CHRONIQUE ET MALADIES RÉNALES CHRONIQUES. item 261.

*Allele*frequencies*. (s.d.). Récupéré sur <http://www.allelefrequencies.net/default.asp>

Arnaiz-Villena A et al. (1995). HLA allele and haplotype frequencies in Algerians. Relatedness to Spaniards and Basques. *Human Immunology* , 43 : 259-68.

B

BARHET C, B. A. (2002). *Guide des analyses spécialisées*. paris: pasteur cerba laboratoire,447-451

Bénédicte stengel, C. C.-A. (2007). Epidimologie de l'insuffisance rénale chronique en france . *Inserm* ,125-127

Benhalima. (2005). Implication du système HLA dans la transplantation rénale a partir du donneur vivant apparente . *thèse de doctorat*,33.

BERDJOUH A et DOUDOU M. (2008). *Prévalence de l'insuffisance rénale dans les région de Ouargla et de Ghardaïa et mise en évidence de méthode de diagnostic et de suivie*. OUARGLA: UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA.

BERNARD M, C. L. (2009). *Transplantation d'organes*. Paris: INSERM.

Bjorkman PJ, S. M. (1987). Structure of the human class I histocompatibility antigen,. *Nature*

BOUBCHIR M, M. (2004). Monographie sur l'insuffisance rénale chronique. Algérie: OPU, P 10-12

Brown JH, J. T. (1993). Three-dimensional structure of the human class II. *Nature* .

C

CAI J and TERASAKI PI, C. (2005). Humoral theory of transplantation: mechanism, prevention, and treatment. *Hum Immunol* , 66:334-342.

Cesbron-Gautier A, G. K. (2007). Système HLA . *Elsevier Masson SAS, Paris* , 20.

Choukroune G, G. (2013). Définition et épidémiologie de l'IRC en France. *Inserm* , 31.

christian boitard, c. c. (2015). La journée mondiale du rein . *fondation du rein* .

Colombani, J. (1993). *HLA : Fonctions immunitaires et applications médicales*. Paris: John Libbey Eurotext, 20-21

C. Bricka, O. A. (2015). Le système HLA dans la population marocaine : revue générale. *Elsevier Masson SAS* , P 300-305.

D

Dussol, B. (2011). différents stades de l'insuffisance rénale chronique. *recommandations Immunoanalyse et biologie spécialisée* , 56-57

E

Eliaou, J. (2007). IMMUNITÉ ADAPTATIVE : STRUCTURE RECONNUES (CMH ET ANTIGÈNES). *Système HLA et antigènes* . EMC, 2-6.

Eliaou, J. (2002). Région HLA et pathologies ostéoarticulaires. *Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS* , 2.

Elyse Poitras, A. H. (2002). La PCR en temps réel: principes et applications . *The Moroccan Society of Biology in Canada* .

EZ1® DNA Blood Handbook. (2010).

F

FIZET, D. (2008). Réunion A.M.A.F. *Etablissement Français du sang Aquitaine* .

G

GOLSHAYAN D, B. L. (2007). From current immunosuppressive strategies to clinical tolerance of allografts. *Transpl Int* , 20:12-24.

Goulet, O. (2012). Système HLA , présentation de l'antigène et réponse immunitaire .

H

HADJ-SAFI L, H. (2013). HYPERTROPHIE VENTRICULAIRE GAUCHE AU COURS DE L'INSUFFISANCE RENALE CHRONIQUE : PREVALENCE ET FACTEURS DE RISQUE. *thèse de doctorat* , 3.

HAS. (2012). Maladie Rénale Chronique de l'adulte. *guide du parcours de soins* , 9.

I

Ian Mackay, F. S. (2000). The HLA system. First of two parts. *ADVANCES IN IMMUNOLOGY* .

J

Jean Dausset, Marika Pla. (1989). *HLA: complexe majeur d'histocompatibilité de l'homme*. paris: Flammarion Médecine-Sciences.

JOULALI T. (2011). LA TRANSPLANTATION RENALE CHEZ L'ADULTE PAR DONNEUR VIVANT APPARENTE. *thèse* , 10.

K

K Ayad S.jendoubi-Ayed, L. L. (2004). HLA class-I and HLA class-II phenotypic, gene and haplotypic frequencies in Tunisians by using molecular typing data. *Brief communication* , 522-524.

L

L. WEEKERS, A. S. (2003). PRÉVENTION DE LA NÉPHROPATHIE DIABÉTIQUE : DE LA MICROALBUMINURIE À L'INSUFFISANCE RÉNALE TERMINALE. *Rev Med Liege* .

LEROUX S. (2010). *caractérisation des anticorps allo-immuns et anti-HLA en transplantation rénale : étude de leur rôle sur le devenir du greffon*. Nantes: université de Nantes.

LETTREUCHE R A, T. A. (2013). Suivi des malades en pre et en post transplantation rénale au niveau de l'unité d'immunologie du CHU de Blida. *Mémoire doctorat en pharmacie* .

M

Margareth Afonso Torres, M. E. (2011). Nomenclature for factors of the HLA system. *medical development* , 1-2.

MARKS R and FINKE J, M. (2006). Biologics in the prevention and treatment of graft rejection. *Springer Semin Immunopathol* , 27: 457-476.

Marsh S, S. (2016). *HLA Nomenclature*. Récupéré sur hla.alleles.org:
<http://hla.alleles.org/>

O

Opelz G, W. T. (1999). *HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative Transplant*. Rev Immunogenet.

P

Prévalence de l'insuffisance rénale dans les région de Ouargla et de Ghardaïa et mise en évidence de méthode dediagnostic et de suivie. (s.d.).

R

Rein, f. d. (2009). l'hypertention arterielle et vos reins. *la fondation canadienne du rein* .

REMACHE A. (2001). LE REIN DANS L'HTA. *Médecine du Maghreb* .

Rhodes DA, Trowsdale J. (1999). Genetics and molecular genetics of the MHC. Rev Immunogenet. 1:21-31.

Retima A, M. D. (2015). Fréquences des allèles HLA types I et II dans une population témoin du nord Est algérien. *Elsevier Masson SAS*.

T

Tiwari J, T. P. (1985). *HLA and disease associations*. New York: Springer-Verlag.

W

WHEATER P.R., Y. B. (2001). Histologie fonctionnelle . *Dc book université s.a* , 288-289.

Z

ZUBER, C. L. (2007). TRANSPLANTATION RÉNALE CHEZ LES PATIENTS À « HAUT RISQUE IMMUNOLOGIQUE ». *FLAMMARION MÉDECINE-SCIENCE* ,5.