

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche scientifique
جامعة محمد الصديق بن يحيى - جيجل -
Université Mohammed Seddik Ben Yahia - Jijel

*Faculté des Sciences de la Nature
et de la Vie
Département : Biologie Moléculaire
et Cellulaire*



كلية علوم الطبيعة و الحياة
قسم البيولوجيا الجزيئية و الخلوية

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme : **Master Académique en Biologie**

Option : Biologie Moléculaire et cellulaire

Thème

Etude du polymorphisme HLA dans la population de l'Est Algérien

Membres de Jury

Présidente : Dr. BOUTENNOUN Hanane

Examinatrice : M^{me} ABBES Arbia

Encadrant : M^{me} BENSEGHIER Salima

Présenté par :

HELLAS Nouzha

BELAIB Loubna

Remerciements

Nous remercions tous d'abord Allah qui nous éclairé le bon chemin.

Nous serons heureuses d'exprimer nos plus vifs remerciements à notre encadreur M^{me} BEN SEGHIER Salima, pour ces précieux conseils, sa collaboration, son aide et son grand soutien lors de la préparation de notre mémoire.

Nous remercions aussi les membres du jury: la présidente Dr. BOUENNOUN Hanane et l'examinatrice notre prof M^{me} ABBES Arbia qui nous ont fait l'honneur de juger notre travail.

Nous adressons particulièrement nos vifs remerciements au Dr BOUCHIHA Hafida médecine assistante au Centre Hospitalo-Universitaire (C-H-U) Constantine, service de physiologie, unité de biologie moléculaire pour son aide et ces conseils durant notre stage à l'hôpital.

Ainsi nous remercions infiniment le professeur IDUI El taib pour son aide et sa gentillesse pour la préparation des papiers du stage.

Nous remercions sincèrement Monsieur CHRAYTIA Hassan et AHMIA Aissa enseignants à l'université du Jijel pour leurs aides au calculs statistiques.

Nous tenons à remercier tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin à élaborer ce travail.

Loubna, Nouzha

Dédicaces

A mon père, La miséricorde de Dieu sur lui,

A ma très chère maman, pour tout son sacrifice, son amour, sa tendresse, son soutien et sa patience tout au long de mes études.

A mes grandes mères, pour leurs prières permanentes,

A mon cher frère, Mohammed pour son encouragement permanent, et son soutien moral,

A toute ma famille pour son soutien tout au long de mon parcours universitaire,

A mon binôme Loubna, A qui je souhaite un avenir radieux plein de réussite,

A mes Amis,

A tous ceux qui me sont chers,

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible,

Merci d'être toujours là pour moi.

Nouzha



A mes chers parents,

A tous mes sœurs,

A tous mes frères,


A tout ma famille,

A tous mes amis,

A mon encadreur M^{me} BEN SEGHTER Salima,

A ma collègue et ma binôme Nouzha,

A tous mes enseignants,



Loubna.

Sommaire

Sommaire	i
Liste des figures	v
Liste des tableaux	vi
Liste des abréviations	viii
Introduction	1

Revue Bibliographique

Chapitre I : Complexe HLA

I.1. Historique	3
I. 2. Génétique du complexe HLA	4
I. 2.1. Organisation génomique	4
I.2.1.1. Région HLA classe I	4
I.2.1.2. Région HLA classe II	4
I. 2.1.3. Région HLA classe III.....	4
I.2.2. Propriétés génétiques du complexe HLA.....	5
I.2.2.1. Polymorphisme.....	5
I.2.2.2. Polygénisme	5
I.2.2.3. Codominance.....	5
I.2.2.4. Transmission en haplotype	6
I.2.3. Nomenclature des molécules et des gènes HLA	6
I.3. Molécules et gènes HLA de classe I.....	7
I.3.1. Structure des molécules de classe I.....	7
I.3.2. Gènes HLA-A. B. C.....	8
I.4. Molécules et gènes HLA de classe II	8
I.4.1. Structure des molécules de classe II	8
I.4.2. Gènes HLA-DR, DQ, DP.....	9
I.5. Distribution et expression des molécules HLA	9

I.5.1. Distribution des molécules HLA.....	10
I.5.2. Expression des gènes du CMH	10
I.5.2.1. Expression des gènes CMH de classe I.....	10
I.5.2.2. Expression des gènes CMH de classe II.....	10
I.6. Fonctions biologique des molécules HLA.....	11
I.6.1. Constitution répertoire T.....	11
I.6.2. Présentation de l'antigène	12
I.6.2.1. Présentation de l'antigène par les molécules HLA de classe I.....	12
I.6.2.2. Présentation de l'antigène par les molécules HLA de classe II	12
I.6.3. Surveillance exercée par les cellules NK (Natural Killer).....	13
I.7. Association HLA et maladies	14
I.7.1. Polyarthrite rhumatoïde (PR)	14
I.7.2. La maladie de Behçet (MB)	14
I.7.3. Rétinopathie diabétique (RD).....	15
I.8. Greffe d'organe	15

Chapitre II : Etude du polymorphisme HLA

II.1. Différents allèles des molécules HLA classe I et II	17
II.2. Méthodes d'étude du polymorphisme HLA.....	18
II.2.1. Typage sérologique.....	18
II.2.1.1. Test de lymphocytotoxicité.....	18
II.2.1.2. Cross-match	19
II.2.2. Typage génomique.....	19
II.2.2.1. PCR-SSO (polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Oligonucleotide).	19
II.2.2.2. PCR- Sequence Specific Primers (SSP).....	20
II.2.3. Typage cellulaire (réaction lymphocytaire mixte).....	20

Partie Pratique

Patients et Méthodes

I. Patients.....	21
II. Méthodes	21
II.1. Technique de séparation lymphocytaire sur FICOLL (La lymphocytotoxicité)	21
II.1.1. Prélèvement sanguin.....	21
II.1.2. Instruction pour le test.....	21
II.1.3. Séparation des lymphocytes.....	21
II.1.4. Expression HLA.....	23
II.1.5. Lecture.....	24
II.2. La technique du CROSS-MATCH	25
II.3. Technique de séparation lymphocytaire par FluoroBeads (Réaction lymphocytaire mixte) .	26
II.3.1. Principe.....	26
II.3.2. Prélèvement.....	26
II.3.3. Instruction pour le test.....	26
II.3.4. Isolement des cellules T FluoroBeads.....	26
II.3.5. Isolement des cellules B FluoroBeads.....	27
II.3.6. Estimation.....	27
II.3.7. Reconstitution du complément.....	27
II.3.8. Injection.....	27
II.3.9. Lecture.....	28
II.3.10. Interprétation.....	28
II.4. Analyse statistique	28

Résultats et Discussion

III. Résultats

III.1. Fréquence des allèles HLA-A et B dans la population de l'Est Algérien	29
III.2. Fréquence des allèles HLA-A dans différentes régions de l'Est Algérien.....	29
III.3. Fréquence des allèles HLA-B dans différentes régions de l'Est Algérien.....	30

III.4. Fréquences des haplotypes HLA : A-A dans la population de l'Est Algérien	31
III.5. Fréquences des haplotypes HLA : B-B dans la population de l'Est Algérien	33
III.6. Fréquences des haplotypes HLA : A-B dans la population de l'Est Algérien	34
IV. Discussion	
IV.1. Comparaison de fréquence des allèles HLA-A et B avec différents populations	35
IV.2. Comparaison des fréquences haplotypiques HLA : A-B avec différents populations	38
Conclusion	41
Références bibliographiques	42
Annexe	I

Liste des figures

Figure 1: Cartographie des gènes HLA sur le chromosome 6.	5
Figure 2 : Nomenclature des molécules et des gènes HLA	6
Figure 3 : Structure des molécules HLA de classe I.	7
Figure 4: Structure des molécules HLA de classe II.	8
Figure 5: Apprêtement des antigènes protéiques.	13
Figure 6: Principe d'une réaction négative en microlymphocytotoxicité.	18
Figure 7: Détection d'allèles HLA par technologie Luminex.	20
Figure 8: Le mélange lymphocytaire plus PBS sur FICOLL.	22
Figure 9: La formation d'un anneau lymphocytaire.	23
Figure 10: Une plaque de TERASAKI prête pour la lecture.	24

Liste des tableaux

Tableau 1 : Distribution tissulaire des molécules HLA.....	10
Tableau 2 : Nombre des allèles HLA.	17
Tableau 3 : Nombre d'allèles des molécules HLA de classe I.	17
Tableau 4 : Nombre d'allèles des molécules HLA de classe II.....	18
Tableau 5 : Interprétation de l'observation microscopique de la lymphocytotoxicité.	25
Tableau 6 : Fréquences alléliques des allèles HLA-A et B dans la population de l'Est Algérien....	29
Tableau 7 : Fréquences alléliques des allèles HLA-A dans différents régions de la population de l'Est Algérien	30
Tableau 8 : Fréquences alléliques des allèles HLA-B dans différents régions de la population de l'Est Algérien.	31
Tableau 9 : Les haplotypes HLA : A-A rencontrés dans la population de l'Est Algérien.	32
Tableau 10 : Les haplotypes HLA : B-B rencontrés dans la population de l'Est Algérien.	33
Tableau 11 : Les haplotypes HLA : A-B rencontrés dans la population de l'Est Algérien.....	34
Tableau 12 : Fréquences alléliques des allèles HLA-A dans différentes populations.....	36
Tableau 13 : Fréquences alléliques des allèles HLA-B dans différentes populations.	38
Tableau 14 : Les haplotypes HLA : A-B les plus fréquemment rencontrés dans la population de l'Est Algérien et les autres populations.....	40

Liste des abréviations

- ACD** : Anticoagulant Citrate Dextrose.
- ADN** : Acide DésoxyriboNucléique.
- ANS** : Anti-inflammatoire Non Stéroïdien.
- Asp** : Acide Aspartique.
- C2** : Facteur 2 du Complément.
- C4A** : facteur 4A du Complément
- CD 1** : Cluster de Différenciation 1.
- CD 2** : Classe de Différenciation 2.
- CD 3** : Classe de Différenciation 3.
- CD 4** : Classe de Différenciation 4.
- CD 7** : Classe de Différenciation 7.
- CD 8** : Classe de Différenciation 8.
- CD19** : Classe de Différenciation 19.
- CDC** : Cytotoxicité Dépendante du Complément.
- CMH** : Complexe Majeur d'Histocompatibilité.
- CPA** : Cellule Présentatrice d'Antigène.
- Cy3** : Cyanine 3
- DSA** : Donor Specific Antibody.
- DT1** : Diabète de Type 1.
- DT2** : Diabète de Type 2.
- Glu** : Acide Glutamique.
- H2** : Histocompatibilité 2 chez les rats.
- HLA** : Human Leukocyte Antigen.
- Hu-1** : "Hu" pour humain et "1" pour le premier système.
- Ig** : Immunoglobulines.
- IgG** : Immunoglobulines G.
- IgM** : Immunoglobulines M.
- IMGT / HLA** : IMmunoGeneTics / Human Leukocyte Antigen.
- KDa** : Kilo-Dalton.
- KIR** : Killer Cell Ig-like Receptor.

li : LA chaîne invariante.

LT : Lymphocyte T.

MB : Maladie de Behçet.

MIC : MHC class I related.

NK : Natural Killer.

OLS : Organes Lymphoïdes Secondaires.

PCR-SSO : Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Oligonucleotide.

PCR-SSP : Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Primers.

pH : Potentiel d'Hydrogène.

PR : Polyarthrite Rhumatoïde.

PRA : Panel Reactive Antibody.

RD : Rétinopathie Diabétique.

Taq polymérase : *Thermus Aquaticus* polymérase.

TCR : T Cells Receptor.

UV : Ultra Violète.

WHO : World Health Organisation.

INTRODUCTION

Les Vandales (Européens) et les Byzantins (Turcs) occupèrent le Maghreb pendant un siècle. Les Arabes, quant à eux, s'installèrent en Maghreb vers le milieu du VII^{ème} siècle. La période othomane du Maghreb a duré du XVI au XIX^{ème} siècle. Au cours de cette période, le Maghreb a connu des immigrations diverses (Andalous chassés d'Espagne, Juifs, Turcs, commerçants européens et esclaves noirs du Soudan). Ce bref rappel historique du peuplement Magrébin permet de comprendre l'originalité et le particularisme de cette population (*Hmida et al., 1995*).

Le complexe majeur d'histocompatibilité est un système multigénique hautement polymorphe codant pour les molécules Human leucocyte Antigen (HLA) situé sur le bras court du chromosome 6 chez l'homme sur une distance de 3,6 méga bases (*The MHC sequencing consortium, 1999*). Il est divisé en trois régions : la région de classe I télomérique, la région de classe II centromérique et la région de classe III intermédiaire, initialement identifiées par J. Dausset et comporte 224 gènes (*The MHC sequencing consortium, 1999 ; Moalic, 2008 et Giannoli, 2011*).

Les molécules HLA codées par ces gènes sont des glycoprotéines transmembranaires exprimées sur toutes les cellules nucléées de l'organisme pour la classe I ou uniquement sur les cellules participant à la réponse immunitaire (monocytes, macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes B et lymphocytes T activés) (pour la classe II). Ces molécules jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la réponse immunitaire. Elles sont capables de reconnaître et de se lier à des antigènes étrangers à l'organisme « non soi » et de les transporter à la surface cellulaire pour les présenter aux lymphocytes T. Elles sont responsables de la reconnaissance du soi et du non soi et, à ce titre, elles définissent l'identité biologique d'un individu (*Brick, 2015*).

Le système HLA est caractérisé par un extrême polymorphisme, chaque gène ayant plusieurs allèles codants pour des protéines différentes. Les gènes HLA étant très proches les uns des autres, toute la région est transmise en bloc (en haplotype) à la descendance. En raison de ces caractéristiques génétiques, l'exploration du système HLA revêt un intérêt capital dans de nombreux domaines dont la médecine (appariement donneur–receveur, aide au diagnostic et à la prédiction de certaines maladies infectieuses), l'anthropologie et la génétique des populations (*Brick, 2015*).

Le système HLA est le système génétique le plus polymorphe chez l'homme. Donc, quelle est la fréquence allélique de ce système dans la population de l'Est Algérien ? Quelle est le degré du polymorphisme de notre population par rapport à d'autres études nationales et internationales ?

Notre objectif était de déterminer les fréquences alléliques des antigènes HLA classe I (loci A et B), ainsi le degré du polymorphisme de notre population étudiée par rapport à d'autres études internationales.

Notre étude a été effectuée au niveau du laboratoire HLA service de physiologie Centre hospitalo-universitaire Ben Badis (C.H.U) Constantine, sur 244 individus de sexe masculin et féminin et d'un âge varié entre 4 mois et 68 ans. Sur lesquels sont réalisés la lymphocytotoxicité, Le CROSS- MATCH et la réaction lymphocytaire mixte.

REVUE

BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I :

COMPLEXE HLA

I.1. Historique

L'histoire de nos connaissances du système HLA est jeune. Comparativement aux découvertes scientifiques qui se sont déjà succédé à un rythme rapide au XIX^{ème} siècle, le XX^{ème} siècle vit une accélération de leur cadence. Dès le début des années 1950, Jean Dausset établit qu'il existe des groupes de globules blancs (groupes leucocytaires), de même qu'il y en a pour les érythrocytes (A, B, AB et O). Il s'est intéressé aux malades qui ont un nombre anormalement bas de globules blancs (leucopéniques). A partir de leur sérum, il découvre l'existence d'anticorps capables d'agglutiner les globules blanc d'un autre individu (*Nydegger, 2009 ; Carosella, 2015*).

Rapidement, il a été s'avéré que ces anticorps antiglobules blancs sont dus aux nombreuses transfusions que le malade a reçues et qu'il ne s'agit pas d'auto-anticorps responsables de la leucopénie. Il en déduit qu'il existe des groupes de globules blancs, comme il existe les groupes de globules rouges. Mais, à la différence des groupes sanguins A, B et O, les anticorps contre les globules blancs n'existent pas à l'état naturel ; l'immunisation par transfusion ou par grossesse est ici nécessaire. C'est alors que Jean Dausset a été imaginé une stratégie simplificatrice : utiliser le sang d'un seul et même donneur pour transfuser le malade qui, de ce fait, ne pourra s'immuniser que contre les globules blancs d'un seul donneur. Ce qui fut fait. Au bout de quelques semaines, Jean Dausset constate l'apparition d'anticorps qui n'agglutinent que les leucocytes de la moitié du panel des donneurs volontaires. Cette découverte fut publiée dans l'article princeps paru en 1958 dans *Acta Haematologica* où Jean Dausset soulignait déjà l'importance possible de ces groupes en transplantation (*Carosella, 2015*).

Jean Dausset fut le premier à réaliser la complexité du système génétique, analogue au système H2 de la souris. Pour démontrer son hypothèse, il testa 50 sérums sur 50 individus à l'aide de deux techniques : leucoagglutination et test de lyse des leucocytes. L'analyse de cet énorme tableau permettait d'affirmer l'existence d'au moins 8 groupes qui devaient appartenir à un système unique que Jean Dausset dénomma Hu-1, selon la nomenclature proposée par George Snell pour les systèmes analogues au système H2 "Hu" pour homme et "1" pour le premier système. Il fallait ensuite prouver que, comme le système H2, le système Hu-1 détermine le devenir des greffes. En 1964, avec l'immunologiste-chirurgien américain Félix Rapaport, il pratique une série de greffes de peau sur des volontaires et montre qu'il y a bien une corrélation entre la compatibilité du système Hu-1 et la survie des greffes de peau. Les groupes leucocytaires sont en réalité des groupes tissulaires ouvrant la voie à la transplantation d'organes. Etudiant les malades greffés de reins, Jean Dausset a pu montrer que la survie du greffon était corrélée au nombre d'incompatibilités dans le

système Hu-1, devenu entre-temps HLA (Human Leucocyte Antigen) (*Ferrer et al., 2005 ; Carosella, 2015*).

I. 2. Génétique du complexe HLA

I. 2.1. Organisation génomique

Le complexe HLA est localisé sur le bras court du chromosome 6 (bande 6p21.3) (**Figure 1**). Il est subdivisé en trois régions comprenant des gènes codant des produits qui diffèrent par leurs localisation, leur structure et fonction (*Chatenoud et François, 2008*).

I.2.1.1. Région HLA de classe I

La région la plus télomérique. Les molécules de classe I sont codées par trois locus principaux A, B et C. On trouve en outre trois autres gènes E, F et G dits non classiques et les gènes apparentés aux classes I (MIC-A, MIC-B et HFE) (**Figure 1**). (*Semana et Quelvenec, 2002*).

I.2.1.2. Région HLA de classe II

Les gènes de classe II se retrouvent dans la région centromérique. C'est dans la région HLA-D de classe II que l'on trouve les gènes codant pour les molécules de CMH de classe II : les régions DR, DQ, DP (**Figure 1**). Chacune des régions contient les gènes A et B codant les deux chaînes de la molécule de classe II (*Georges, 1999*).

I. 2.1.3. Région HLA de classe III

La région de classe III, situés entre les deux classes précédentes (**Figure 1**), ne contient pas de gènes d'histocompatibilité mais de nombreux gènes avec des fonctions différents codant pour des protéines impliquées dans la réponse immunitaire : certains facteurs du complément (C2, C4A), des protéines du choc thermique et des cytokines (*Male, 2005 ; Agrawal, 2007*).

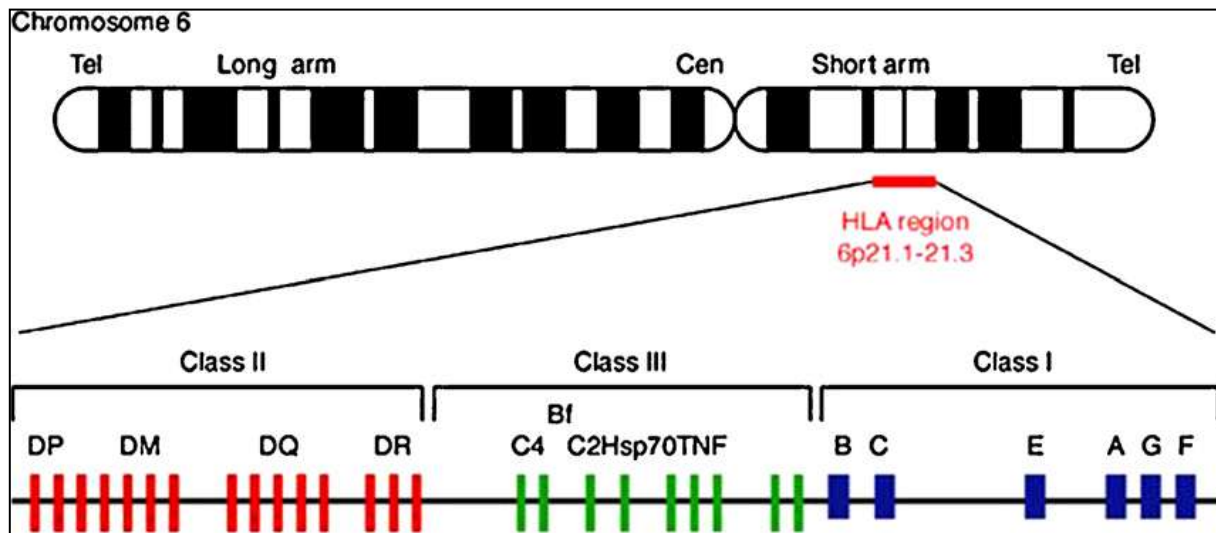


Figure 1: Cartographie des gènes HLA sur le chromosome 6 (Moalic, 2008).

I.2.2. Propriétés génétiques du complexe HLA

On distingue quatre propriétés génétiques fondamentales.

I.2.2.1. Polymorphisme

Le polymorphisme correspond au fait que chaque gène est multiallélique, ce qui conduit à un grand nombre de combinaisons possibles sur chaque chromosome (haplotype), le nombre des combinaisons génotypiques dépasse 10^{10} (Revillard, 2001). Les différences alléliques peuvent correspondre à la mutation d'une ou plusieurs bases ou, plus souvent, à plusieurs substitutions à distance dans la séquence codante, ce qui correspond alors à un mécanisme de conversion génique, par insertion ou échange d'une séquence venant d'un autre gène ou d'un pseudogène. La diversité des molécules HLA représente un moyen d'adaptation de l'espèce pour la défense contre les agents pathogènes (Revillard, 2001 ; Chatenoud et François, 2008).

I.2.2.2. Polygénisme

Il existe plusieurs gènes codant les molécules de classe I et de classe II du CMH. De manière simplifiée, on compte : trois gènes dits classiques pour la classe I : HLA-A, B, C, et six gènes pour la classe II : HLA-DPA, DPB, DQA, DQB, DRA et DRB (Espinosa et Chillet, 2006).

I.2.2.3. Codominance

Pour chaque locus, le gène d'origine paternelle et le gène d'origine maternelle sont exprimés dans la même cellule. Les protéines codées par chaque haplotype sont donc coexprimées par chaque cellule. Donc, chaque enfant aura une moitié du génome du père et une autre de la mère, appelé

haplotype et un enfant sur 4 aura une forte chance d'être HLA identique avec ses frères (*Espinosa et Chillet, 2006*).

I.2.2.4. Transmission en haplotype

Le système HLA comporte plus de 18 000 allèles. Ceux-ci sont organisés en haplotypes qui se transmettent régulièrement en bloc de parents à enfants. Ainsi, les principaux allèles HLA classe I et II sont en déséquilibre de liaison. Cela explique aussi une distribution ethnogéographique différenciée au niveau mondial faisant des allèles HLA un outil performant de suivi anthropologique (génétique des populations) (*Charron, 2012*).

I.2.3. Nomenclature des molécules et des gènes HLA

La nomenclature HLA doit respecter des critères précis qui permettent son homogénéité entre les résultats au niveau international. Elle est tenue à jour par le comité international « WHO nomenclature committee ». La nomenclature est adaptée à la technique utilisée pour réaliser le typage (*Jacques, 2015*). La nomenclature sérologique identifie le locus suivi d'un numéro identifiant l'antigène (exemples : HLA-A2, HLA-B27, HLA-DR4). La nomenclature génomique identifie le gène, suivi d'un astérisque et d'un numéro à deux chiffres (définit la spécificité de l'allèle) ou quatre à huit chiffres (précise le variant allélique d'un allèle donné) (**Figure 2**) (*Moalic, 2008*).

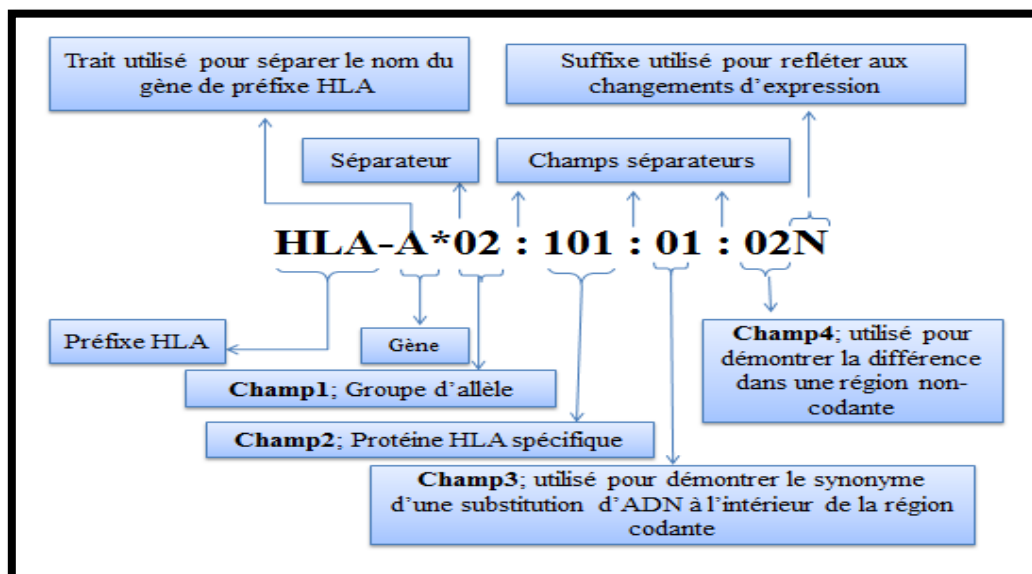


Figure 2 : Nomenclature des molécules et des gènes HLA (*March et al., 2010 ; <http://hla.alleles.org/nomenclature/index.html>*).

I.3. Molécules et gènes HLA de classe I

I.3.1. Structure des molécules de classe I

Les molécules de classe I résultent de l'association non-covalente d'une chaîne lourde de 45 kDa comportant trois domaines semblables à ceux des immunoglobulines $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ contenant chacun environ 90 amino acides, d'un domaine transmembranaire de 25 amino acides hydrophobes suivi d'un court fragment hydrophile, d'un domaine C-terminal intra cytoplasmique de 30 acides aminés et de la $\beta 2$ -microglobuline (12 kDa), dont le gène n'est pas localisé dans le CMH (**Figure 3**) (*Bergereau, 2010*).

La purification et la cristallisation de la portion extracellulaire ont mis en évidence deux paires de domaines interactifs : une paire, éloignée de la membrane, constituée des domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ et une paire proximale composée des domaines $\alpha 3$ et de la $\beta 2$ -microglobuline. Les séquences peptidiques du domaine $\alpha 3$ et de la $\beta 2$ -microglobuline ont des structures repliées similaires alors que les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$, en se repliant, ne forment qu'une seule structure de deux segments d'hélice α allongés sur un feuillet de huit brins β antiparallèles. Cette disposition des domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ crée une grande fente ou sillon, constituant le site dans lequel les antigènes peptidiques se lient aux molécules du CMH et où se concentre le polymorphisme qui détermine la reconnaissance de l'antigène par les LT (*Bergereau, 2010*).

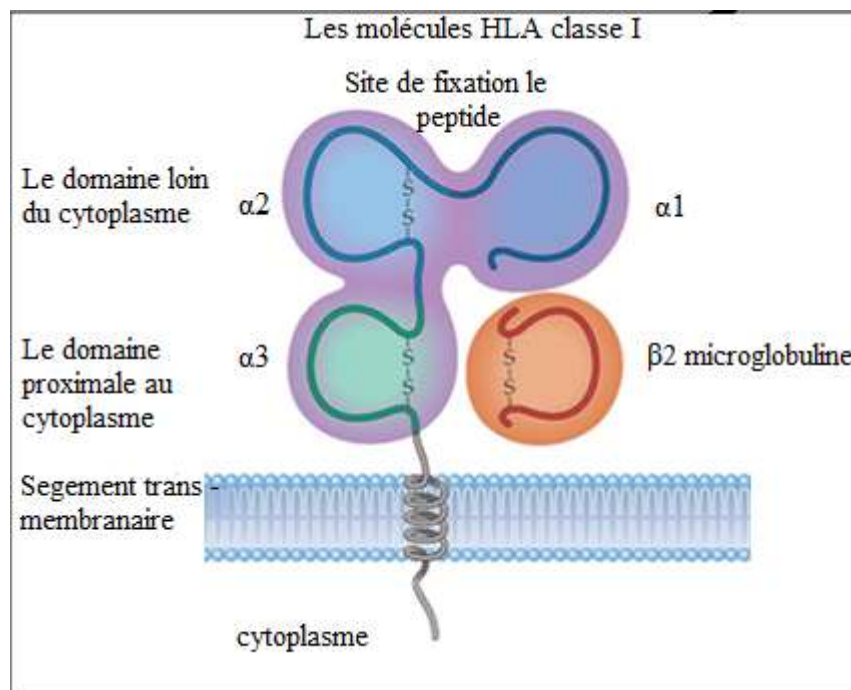


Figure 3 : Structure des molécules HLA de classe I (*Moalic et Ferec, 2005*).

I.3.2. Gènes HLA-A. B. C

Les gènes HLA A, B et C sont organisés en 8 exons séparés par 7 introns. Ils codent pour une chaîne lourde α de 44 kDa ancrée dans la membrane qui se compose d'une partie extracellulaire organisée en trois domaines $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$, d'une partie membranaire et d'une partie intracytoplasmique. Cette chaîne lourde α est associée de façon non covalente à une chaîne légère de 12 kDa, la $\beta 2$ microglobuline ($\beta 2m$) dont le gène est localisé sur le chromosome 15. L'exon 1 code pour le peptide signal, les exons 2,3 et 4 codent pour les trois domaines extramembranaires, l'exon 5 code pour la région transmembranaire, les exons 6 et 7 codent pour la partie Intracytoplasmique. L'exon 8 est constitué d'une séquence non traduite (3' UT) de plus de 400 nucléotides. Les gènes de classe I sont très polymorphes, ce qu'ils codent de nombreux variant alléliques qui diffèrent par leur composition en acides aminés (*Semana et Quelvennec, 2002*).

I.4. Molécules et gènes HLA de classe II

I.4.1. Structure des molécules de classe II

La molécule HLA de classe II est un hétérodimère de deux glycoprotéines transmembranaires, les chaînes α (33-35 kDa) et β (26-28 kDa) (**Figure 4**). Orienté avec leur extrémité amino-terminale se termine à l'extérieur de la cellule, les deux chaînes comprennent deux domaines extracellulaires, chacun de 90-100 acides aminés, relié à une courte queue cytoplasmique par une séquence hydrophobe qui fait un seul passage à travers la membrane cellulaire (*Marsh, 2000*).

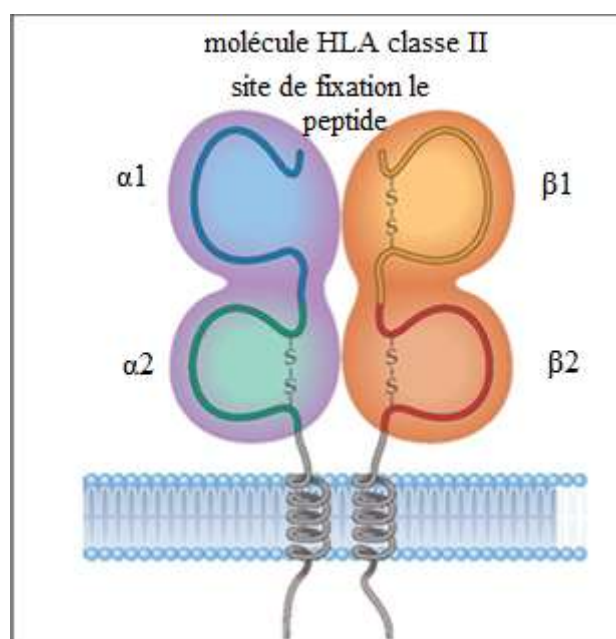


Figure 4 : Structure des molécules HLA classe II (*Moalic et Ferec, 2005*).

I.4.2. Gènes HLA-DR, DQ, DP

L'organisation génomique de la région HLA de classe II est beaucoup plus complexe que celle de la région de classe I. Les chaînes α et β des molécules HLA-DR sont respectivement codées par les gènes HLA-DRA et HLA-DRB1. Le gène HLA-DRA est monomorphe et code pour la même chaîne pour tous les individus. Trois autres gènes HLADRB3, HLA-DRB4 et HLA-DRB5 existent et codent, selon l'haplotype, pour une seconde chaîne, qui s'associe également à la chaîne α pour donner une seconde molécule HLA-DR à la surface cellulaire. Pour les loci HLA-DQ et HLA-DP, les gènes HLA-DQA1, DQA2, DPA1, DPA2 et les gènes HLA-DQB1, DQB2, DPB1 et DPB2 existent, mais seuls les gènes A1 et B1 sont fonctionnels et codent pour les chaînes α et β , qui s'associent pour former une molécule. Pour les gènes codant pour la chaîne β de classe II, le polymorphisme est situé au niveau de l'exon 2 des gènes DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQB1 et DPB1 (*Moalic et Ferec, 2005*).

Les gènes de classes II comportent 5 ou 6 exons: les gènes A et DQB 1 comportent 5 exons, les gènes DRB 1 et DPB 1 comportent 6 exons ; l'exon 1 code le peptide signal, les exons 2 et 3 pour les domaines extracellulaires, l'exon 4 pour le peptide de connexion, la région transmembranaire et le début de la région intracytoplasmique, les exons 5 et 6 pour la fin de la région cytoplasmique et la région 3' non transcrite. Tous les gènes de classe II sont très polymorphes, à l'exception du gène DRA qui est monomorphe et code une chaîne α identique chez tous les individus (*Georges, 1999 ; Chatenoud et François, 2008*).

I.5. Distribution et expression des molécules HLA

I.5.1. Distribution des molécules HLA

La distribution tissulaire des molécules HLA de classe I (conventionnelles A, B, C) est très ubiquitaire. Dans le sang, à l'exception des globules rouges, toutes les cellules en possèdent à leur surface. La plupart des organes et tissus les expriment avec quelques exceptions : cellules et vaisseaux du système nerveux central, hépatocytes, pancréas exocrine (**Tableau 1**) (*Seydou gaoh, 2006*).

Les produits de classe II sont exprimés constitutivement sur les lymphocytes B, les macrophages / monocytes, les cellules épithéliales thymiques, les endothéliums des vaisseaux capillaires et certains épithéliums. L'expression de ces molécules est également inductible sur de nombreuses cellules, en particulier sur les lymphocytes T activés (*Georges, 1999*).

Tableau 1 : Distribution tissulaire des molécules HLA (*Seydou gaoh, 2006*).

Tissus	HLA Classe I	HLA Classe II
Lymphocytes T	+++	+/-
Lymphocytes T activés	+++	++
Lymphocytes B	+++	+++
Macrophages	+++	++
Autres CPA	+++	+++
Epithélium thymique	+	+++
Neutrophiles	+++	-
Hépatocytes	+	-
Rein	+	-
SNC	+	-
Erythrocytes	-	-

+++ : Forte expression ; ++ : expression élevée ; + : Faible expression ; +/- : Expression / pas d'expression ; - : Pas d'expression.

I.5.2. Expression des gènes du CMH

L'expression des gènes du CMH classique dépend de leur classe, du type cellulaire, et est influencée par des cytokines pro-inflammatoires (*Béné et al., 2013*).

I.5.2.1. Expression des gènes CMH de classe I

Pratiquement toutes les cellules nucléées expriment des molécules CMH de classe I. leur densité varie selon le type cellulaire. On observe une forte densité (10^5 par cellule) sur les lymphocytes, les monocytes / macrophages, les cellules dendritiques ; une densité intermédiaire (10^4) sur les cellules épithéliales et endothéliales ; une densité faible voire nulle sur les cellules du pancréas, des glandes salivaires, les hépatocytes, la cornée, les hématies. La densité d'expression peut augmenter dans un contexte inflammatoire (*Béné et al., 2013*).

I.5.2.2. Expression des gènes CMH de classe II

L'expression des molécules CMH de classe II est limitée à l'état basal aux cellules présentatrices d'antigènes professionnelles : cellules dendritiques, monocytes / macrophages et lymphocytes B. L'activation de ces cellules augmente la densité d'expression des molécules CMH II à leur surface. Les lymphocytes T quiescents n'expriment pas les molécules CMH de classe II. Leur expression est induite par l'activation de ces cellules. Les cellules épithéliales et endothéliales

n'expriment pas les molécules CMH de classe II à l'état basal, mais peuvent exprimer dans un contexte inflammatoire (*Béné et al., 2013*).

I.6. Fonctions biologique des molécules HLA

I.6.1. Constitution répertoire T

Le développement du pré-thymocyte a lieu dans le foie fœtal et la moelle osseuse. Après colonisation du thymus, elle se transforme en thymocyte précoce qui est caractérisé par l'expression des marqueurs de surface CD2 et CD7 (étape 1 de la différenciation des cellules T). Ne possédant ni le marqueur CD4 ni le marqueur CD8, ces cellules sont qualifiées de doubles négatives. À la prochaine étape de maturation (étape II), le thymocyte présente en général le marqueur CD 1, caractéristique des thymocytes, et possède également les deux marqueurs CD4 et CD8 (double positif). De plus, les chaînes α et β du TCR sont exprimées à la surface, en association avec les molécules du complexe du récepteur des antigènes CD3. Cette étape est suivie par un pas décisif vers la maturation en cellule T proprement dite. L'expression de l'antigène CD1 est perdue, et les thymocytes se divisent en deux populations qui portent soit le marqueur CD4 soit le marqueur CD8, le premier caractérisant les cellules T auxiliaires (T helper) et le second marquant les cellules cytotoxiques (cytotoxic T cells, CTL) (*Burmester et Pezzutto, 2000*).

Les précurseurs des lymphocytes T sont acheminés de la moelle osseuse vers le thymus. C'est dans cet organe lymphoïde primaire que se joue leur sélection, les autorisant ou non à poursuivre leur vie en dehors du thymus, pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires (OLS). Ils subissent dans le thymus deux sélections (*Jacques, 2015*) :

- **Sélection positive**

Pour permettre au lymphocyte T d'assurer sa fonction, le TCR ainsi généré doit être capable de reconnaître le CMH du soi. Malheureusement, en raison du caractère stochastique du réarrangement somatique, seuls 5% des TCR générés vont être réellement capables d'interagir avec les complexes peptide-CMH du soi (*Santolaria, 2009*). Une sélection des lymphocytes T dits « utiles » est donc indispensable. Cette étape de « sélection positive » s'effectue par défaut. Près de 90% des thymocytes meurent donc par négligence, car ils ne peuvent intégrer les signaux, dépendants de l'engagement du TCR, nécessaires à leur survie (*Santolaria, 2009*).

Cette étape a été mise en évidence dès les années 70 : Bevan et al. Montraient, à l'aide de chimères, que la spécificité des lymphocytes T d'un animal était restreinte aux molécules de CMH exprimées par ses cellules non hématopoïétiques. Peu après, l'équipe de Zinkernagel observait que la transplantation d'un thymus allogénique chez des chimères thymectomisées induit chez les cellules T du receveur une spécificité vis-à-vis des molécules de CMH allogénique. Elle montrait ainsi l'importance du thymus, et notamment de l'épithélium thymique, dans ce phénomène (*Santolaria, 2009*).

- **La sélection négative**

Assure le phénomène de tolérance au soi en détectant et détruisant les lymphocytes T autoréactifs, qui reconnaissent les peptides du soi présentés par les molécules HLA. Après leur maturation thymique, les lymphocytes T naïfs et quiescents migrent dans les OLS. Pendant cette phase, leur rencontre avec un peptide à l'origine de leur stimulation se fait par l'intermédiaire des molécules de classe I et II des CPA professionnelles. Il s'agit des cellules dendritiques, qui migrent dans les OLS après acquisition d'un antigène étranger. Les CPA présentent les peptides aux lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ grâce, respectivement, à leurs molécules de classe I et de classe II. Elles mettent également en jeu le phénomène de présentation croisée, permettant ainsi la présentation de peptides d'origine exogène par les molécules HLA de classe I, aux lymphocytes TCD8⁺ (*Jacques, 2015*).

I.6.2. Présentation de l'antigène

I.6.2.1. Présentation de l'antigène par les molécules HLA de classe I

Les molécules HLA de classe I présentent aux lymphocytes T CD8 cytotoxiques les peptides issus de la dégradation de protéines d'origines endogène, synthétisées par la cellule et cytosoliques (**Figure 4**). Il peut s'agir de protéines du soi (protéines intracellulaires normales), du soi modifié (protéines tumorales) ou de protéines virales. L'expression des molécules HLA de classe I étant ubiquitaire, quel que soit le type de cellule, tissu ou organe, les peptides dérivés des protéines cellulaires endogènes peuvent être présentés et reconnus par les lymphocytes T CD8 (*Chatenoud et François, 2008*).

I.6.2.2. Présentation de l'antigène par les molécules HLA de classe II

Dès sa synthèse dans le réticulum endoplasmique, l'hétérodimère CMH de classe II s'associe à la protéine invariante Ii. La chaîne Ii s'enroule (comme le serpent d'un caducée) autour de l'hétérodimère, avec deux conséquences importantes :

- Elle obstrue le sillon de présentation, ce qui empêche la capture d'un peptide présent dans le Réticulum Endoplasmique (RE).
- Elle déroute le complexe (hétérodimère de classe II + li) vers les vésicules intracytoplasmiques composant l'endosome. L'endosome est un compartiment subcellulaire comprenant des vésicules d'acidité croissante qui assure le recyclage des membranes de la cellule (processus normal et permanent ; il s'agit donc de protéines endogènes du « soi », l'ingestion de protéines exogènes et la fusion avec les lysosomes, qui apportent des protéases actives à pH acide (**Figure 5**) (Béné et al., 2013).

La conjonction du transport du complexe (classe II + li) vers une vésicule de l'endosome permet aux protéases lysosomiales de fragmenter les protéines captées dans la vésicule et de rogner progressivement la chaîne li. Un peptide intralysosomal, dérivé des protéines dégradées peut alors s'enchâsser, ce qui permet à la molécule de classe II chargée en peptide de gagner la membrane plasmique. Les molécules de classe II présentent donc en surface un échantillon « mixte », issu des protéines transmembranaires du « soi » recyclées et des protéines exogènes (Béné et al., 2013).

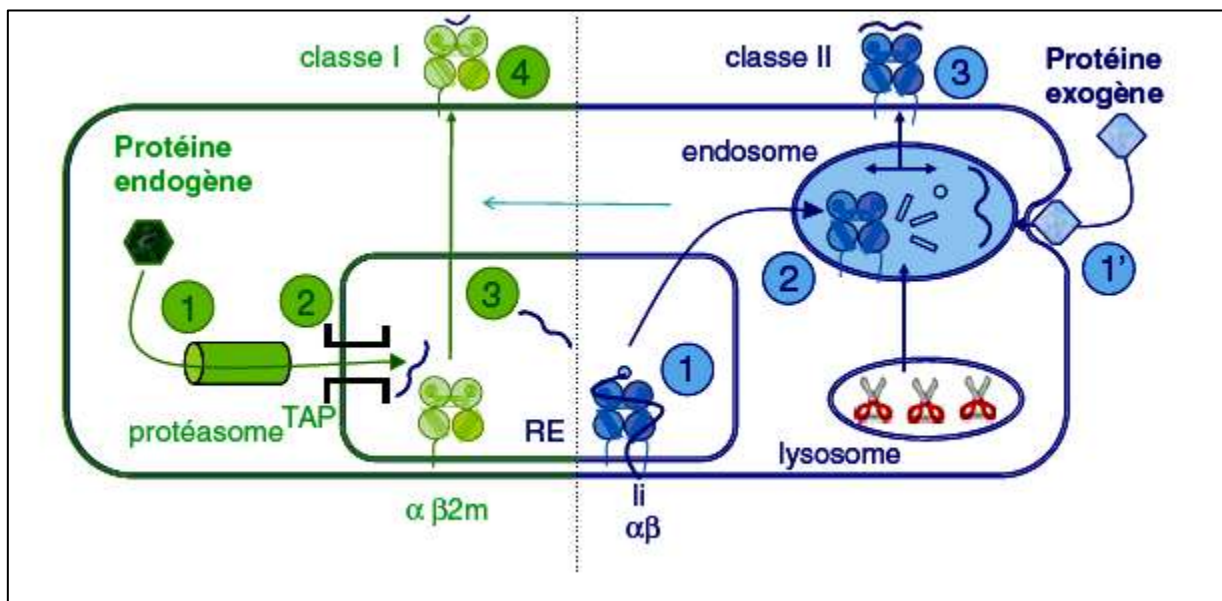


Figure 5 : Apprêtement des antigènes protéiques (Béné et al., 2013).

I.6.3. Surveillance exercée par les cellules NK (Natural Killer)

Les molécules HLA de classe I ont pour autre mission la surveillance de l'intégrité cellulaire. En effet, les molécules HLA de classe I sont reconnues par les récepteurs de surface des cellules NK, au niveau de leurs domaines non polymorphiques. Ces récepteurs jouent un rôle fondamental de régulation de l'activité cytolytique et productrice de cytokines des cellules NK.

Trois grandes familles de récepteurs ont été décrites à leur surface, la plus connue appartient à la super famille des immunoglobulines, nommée Killer cell Ig-like Receptor (KIR). La liaison d'une molécule HLA de classe I au récepteur KIR entraîne la génération d'un signal qui peut être inhibiteur ou activateur, selon le type de protéine KIR. Ainsi, une cellule qui a perdu partiellement ou totalement l'expression de ses molécules HLA de classe I sera détruite lors de sa rencontre avec une cellule NK (*Jacques, 2015*).

I.7. Association HLA et maladies

I.7.1. Polyarthrite rhumatoïde (PR)

L'identification de l'association de la PR au polymorphisme des molécules HLA a mené à l'élaboration de l'hypothèse de l'épitope partagé (shared epitope hypothesis). Cette dernière postule que l'association concerne moins certains allèles HLA que des épitopes partagés par plusieurs molécules HLA-DR (particulièrement DR4 et DR1). L'allèle DR4 prédispose à la PR, surtout chez les individus homozygotes (effet de dose), et est associé à une évolution plus sévère avec des destructions articulaires importantes (*Burmester et Pezzutto, 2000*).

Les molécules HLA de classe II semblent présenter un peptide d'origine étrangère ou autologue déclenchant la maladie. Les TCR des cellules répondeuses interagissent avec la troisième région hypervariable des molécules de classe II qui possèdent une structure hélicoïdale. Cette région comporte des positions fortement variables codées par l'exon correspondant au premier domaine du gène. La substitution des résidus neutres ou basiques dans les positions 70 et 71 ou 74 par les résidus acides Asp ou Glu élimine l'association à la maladie. Les molécules HLA modifiées semblent incapables de fixer le peptide arthritogène avec une affinité suffisante ou ne peuvent être reconnues par les TCR appropriés (*Burmester et Pezzutto, 2000*).

I.7.2. Maladie de Behçet (MB)

La maladie de Behçet est une maladie inflammatoire systémique multifactorielle. Cette pathologie se caractérise par des signes cliniques majeurs et mineurs, d'expression et d'intensité variables (*Bennani, 2009*). La MB est une maladie multifactorielle au cours de laquelle sont intriqués des mécanismes intrinsèques (prédisposition génétique) et extrinsèques (en particulier micro-organismes). L'association génétique de HLA-B51 avec la MB a été initialement rapportée en 1982 par Ohno *et al* 1982. Elle a été par la suite confirmée dans plusieurs ethnies (*Kamoun, 2012*).

I.7.3. Rétinopathie diabétique (RD)

La RD est la complication microvasculaire la plus fréquente du diabète. Elle demeure l'une des principales causes de cécité dans le monde chez les adultes âgés de 20 à 74 ans. La RD est l'association de deux phénomènes : hyperperméabilité et occlusion des capillaires rétiens responsables respectivement des manifestations œdémateuses et ischémiques de la rétine. Les premières modifications structurales des microvaisseaux rétiens observées au cours du diabète sont : un épaissement de la membrane basale, une disparition sélective des péricytes par le phénomène d'apoptose et une altération des cellules endothéliales (*Raache, 2013*). En Algérie, la prévalence de la RD est de 2,4 % (*Raache, 2013*). L'étude de Raache et al a démontré que les antigènes HLA-A29 et HLA-DR9 sont probablement des marqueurs de susceptibilité à la RD et que l'antigène HLA-B49 a un effet protecteur dans la population algérienne est d'autant plus élevée en cas du diabète de type 1 (DT1) que le diabète de type 2 (DT2) (90 % vs 60 %) (*Raache, 2013*).

I.8. Greffe d'organe

L'élément clé du système immunitaire est le complexe majeur d'histocompatibilité, chez l'homme. Leur principale fonction est de protéger l'individu principalement contre les infections. Cette fonction indispensable à la vie implique donc la nécessité de pouvoir distinguer les antigènes du soi et du non-soi (dits allo-antigènes) afin de mettre en œuvre une réponse de défense vis-à-vis de cet « envahisseur ». Ce système de reconnaissance, très élaboré, est particulièrement spécifique et permet ainsi d'orienter les cellules effectrices de la réponse immunitaire vers l'élément agresseur (bactérie, virus) mais aussi d'empêcher une réponse immunitaire vis-à-vis de cellules appartenant à son propre organisme (*Kleinclauss, 2016*). Ainsi, un greffon transplanté va être reconnu comme n'appartenant pas « au soi » et va donc être considéré comme une agression. Une réaction immunitaire, appelé réponse allogénique, va donc être mise en œuvre et dirigée contre le greffon aboutissant sans intervention médicamenteuse au rejet du greffon. Les principaux loci impliqués dans la réponse allo-immune en transplantation sont les loci HLA-A, HLA-B, HLA-DR et DQ (*Kleinclauss, 2016*).

CHAPITRE II : ETUDE DU POLYMORPHISME HLA

II.1. Différents allèles des molécules HLA classe I et II

Il y a actuellement 18 181 HLA et allèles apparentés décrits par la nomenclature HLA et inclus dans la base de données IMGT / HLA. Les nombres ci-dessous (**Tableau 2, 3 et 4**) représentent le nombre d'allèles nommés pour chaque gène de la classe I et II à partir de l'année 1987 jusqu'à la fin de décembre 2017. Ce nombre inclut les allèles qui ont été nommés mais dont les séquences sont encore confidentielles. Les nombres ci-dessous n'incluent pas les noms des allèles supprimés. La liste complète des protéines de classe I et II est présentée dans (**l'annexe 1**) (<http://hla.alleles.org/nomenclature/index.html>).

Tableau 2 : Nombre des allèles HLA (<http://hla.alleles.org/nomenclature/index.html>).

Nombre des allèles HLA	
HLA classe I	13 324
HLA classe II	4 857
Total	18 181

Tableau 3 : Nombre d'allèles des molécules HLA de classe I (<http://hla.alleles.org/nomenclature/index.html>).

HLA class I						
Gène	A	B	C	E	F	G
Allèles	4 200	5 091	3 854	27	30	60
Protéines	2 923	3 664	2 644	8	5	19
Nulles	200	150	144	1	0	3

Tableau 4 : Nombre d'allèles des molécules HLA de classe II (<http://hla.alleles.org/nomenclature/index.html>).

HLA class II												
Gène	DRA	DRB	DQA1	DQB1	DPA1	DPA2	DPB1	DPB2	DMA	DMB	DOA	DOB
Allèles	7	2 464	94	1 196	65	5	975	6	7	13	12	13
Protéines	2	1 793	35	806	27	2	675	3	4	7	3	5
Nulles	0	71	3	33	0	0	26	0	0	0	1	0
HLA classe II: les allèles DRB												
Gène	DRB1	DRB2	DRB3	DRB4	DRB5	DRB6	DRB7	DRB8	DRB9			
Allèles	2,165	1	157	74	55	3	2	1	6			
Protéines	1,559	0	128	57	49	0	0	0	0			
Nulles	54	0	5	9	3	0	0	0	0			

II.2. Méthodes d'étude du polymorphisme HLA

II.2.1. Typage sérologique

II.2.1.1. Test de lymphocytotoxicité

La technique de référence pour les typages HLA est la technique sérologique de microlymphocytotoxicité complément dépendante (LCT). Les lymphocytes des patients ayant en surface des antigènes HLA sont déposés dans les puits d'une plaque, pour laquelle chaque puits contient des anticorps monoclonaux ayant une spécificité HLA déterminée. Si l'anticorps monoclonal a reconnu l'antigène lui correspondant à la surface d'un lymphocyte donné, l'immun complexe ainsi formé active le complément de lapin rajouté dans le puits. Il s'ensuit une lyse de la cellule, qui permet à un colorant fluorogénique ajouté par la suite, de pénétrer dans la cellule. La lecture de la plaque au microscope permet de détecter les puits dans lesquels a eu lieu la lyse (**Figure 5**). La technique de LCT permet d'effectuer des typages HLA-A, HLA-B, HLA-DR et HLA-DQ; cependant, cette technique n'est pratiquement plus utilisée que pour réaliser des typages HLA-A et HLA-B (*Moalic et Ferec, 2005*).

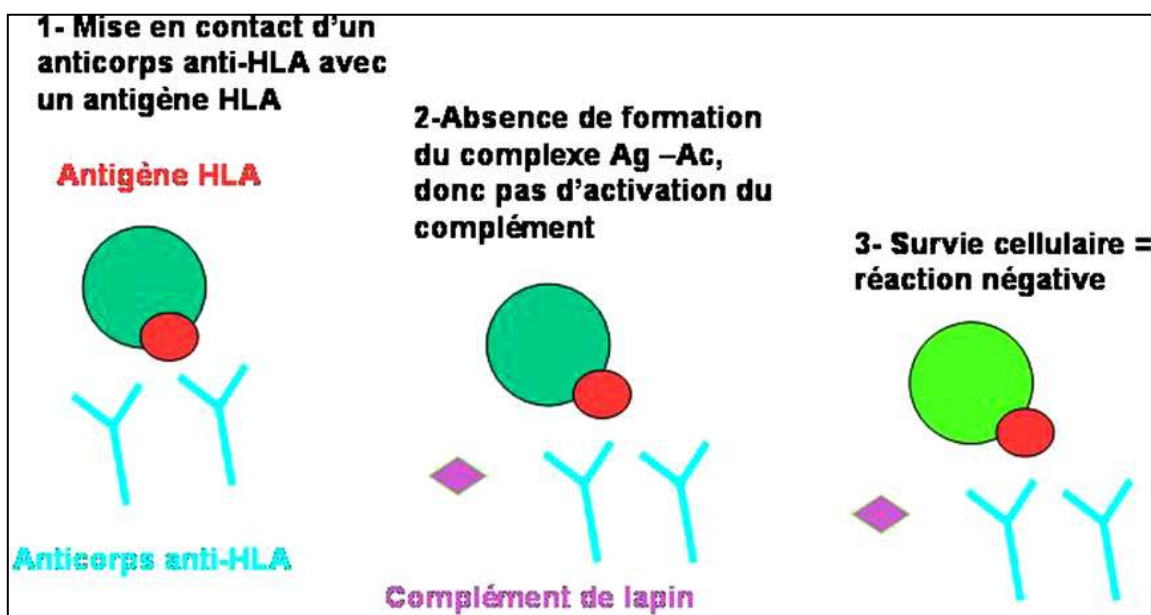


Figure 6 : Principe d'une réaction négative en microlymphocytotoxicité (*Moalic, 2008*).

II.2.1.2. Cross-match

Le Cross-match permet de rechercher au sein du sérum du receveur la présence d'anticorps anti-HLA dirigés contre un panel de lymphocytes congelés représentatif de la répartition HLA dans la population générale (tenant compte des variations régionales du typage HLA). La présence d'une lyse cellulaire détermine la positivité de la CDC et confirme la présence d'anticorps anti-HLA. Ces anticorps sont appelés Panel reactive antibody (PRA) et sont exprimés en pourcentage représentant le pourcentage de lyse cellulaire sur le nombre de cellules du panel. Ce pourcentage de PRA représente le nombre de donneur non utilisable du fait de la présence d'anticorps DSA (*Kleinclauss et al., 2016*).

II.2.2. Typage génomique

II.2.2.1. PCR-SSO (polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Oligonucleotide).

La technique de PCR-SSO reverse en milieu liquide est adaptée à la technologie Luminex. Ainsi sur chaque type de microsphères est fixé, grâce à des groupements carboxyles, un oligonucléotide unique. Avant lecture au Luminex plusieurs étapes sont nécessaires:

1. Amplification des exons sélectionnés selon le typage, en présence de Taq polymérase et des amorces marqués directement ou indirectement par une autre molécule fluorescente (Cy3 ou biotine).
2. Hybridation entre les oligo-nucléotides fixés sur les billes et l'ADN amplifié marqué.
3. Selon le système utilisé (si l'amorce biotinyllé) une dernière étape consiste à révéler les fragments d'ADN fixés sur les billes par la streptavidine/phycoérythrine (**Figure 6**) (*Cesbron-Gautier, 2004*).

La technologie Luminex s'avère être la technique la plus sensible de toutes. Elle est fondée sur le principe de la cytométrie de flux alliant l'utilisation de microbilles fluorescentes en polystyrène et une double lecture après excitation par deux faisceaux laser. En variant la proportion des deux fluorochromes, on obtient une gamme possible de cent catégories de microsphères, chacune étant caractérisée par un code couleur selon l'intensité de fluorescence émise. Chaque type de bille est recouvert d'antigènes HLA différents. La présence d'anticorps spécifiques dans le sérum testé sera révélée par des anticorps anti-IgG humaines conjugués à la phycoérythrine. Le laser rouge à diode (633 nm) excite les fluorochromes incorporés dans les billes induisant l'émission de fluorescence rouge (675 nm) et infrarouge (712 nm) ce qui permet l'identification du type de bille.

Le laser vert excite la phycoérythrine permettant la détection d'anticorps anti-HLA fixés sur un type de billes spécifique (Giannoli, 2011).

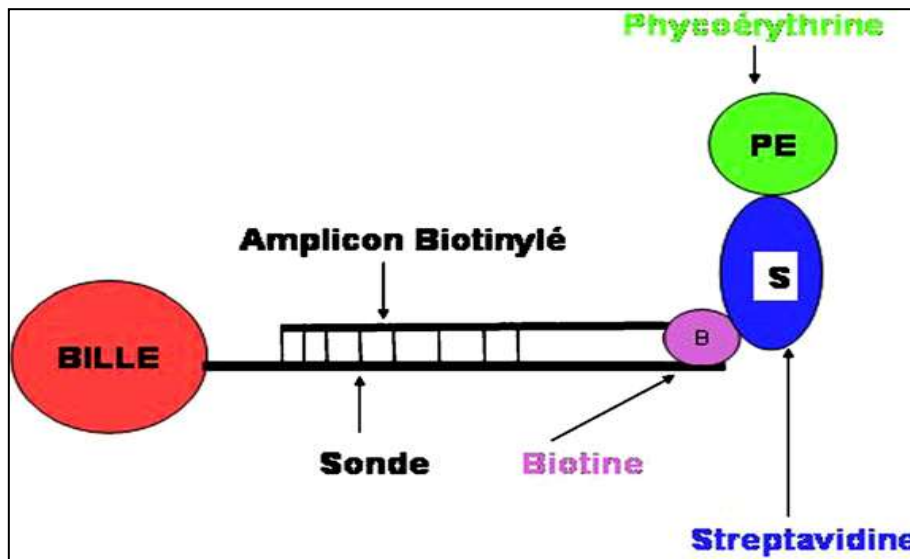


Figure 7: Détection d'allèles HLA par technologie Luminex (Moalic, 2008).

II.2.2.2. PCR- Sequence Specific Primers (SSP)

La technique de PCR (SSP) a été développée en 1992 et utilise une ou deux amorces judicieusement choisies pour n'être capables de s'hybrider qu'avec une séquence déterminée spécifique d'un allèle ou d'un groupe d'allèle. L'amplification ne sera vraiment effective que si la séquence de l'amorce est complémentaire de la séquence présente dans l'ADN génomique. Un gel d'électrophorèse en agarose à 2 % après coloration de l'ADN au bromure d'éthidium (agent s'intercalant dans l'ADN), visualisé sous UV permet de voir les fragments amplifiés. Il s'agit d'une technique rapide, plutôt réservée aux typages ponctuels comme la demande de typage HLA pour les dons d'organes. Elle génère très peu d'ambiguïtés de typages (c'est-à-dire que plusieurs possibilités de typage existent pour le même individu), mais elle ne détecte pas les nouveaux allèles (Moalic, 2008).

II.2.3. Typage cellulaire (réaction lymphocytaire mixte)

La réaction lymphocytaire mixte est une technique de typage des cellules, dans laquelle les lymphocytes de différents individus sont cocultivés. Si les cellules sont différentes, elles répondent en proliférant. L'épreuve peut être réalisée soit de façon bidirectionnelle (chaque lot de cellules réagit contre l'autre), soit unidirectionnelle, dans laquelle les cellules stimulantes sont traitées de façon à ne pas pouvoir répondre. Seules les cellules répondeuses vont proliférer. L'absence de réponse indique que les cellules à typer partagent une spécificité avec les cellules de typage (Male, 2005).

PARTIE PRATIQUE

PATIENTS ET METHODES

I. Patients

Notre étude a été effectuée au niveau du laboratoire HLA service de physiologie – C.H.U-Constantine, sur 244 individus de sexe masculin et féminin et d'un âge varié entre 4 mois et 68 ans, dans une période entre Janvier 2016 à Avril 2018, sur lesquels sont réalisés :

- La lymphocytotoxicité.
- Le CROSS- MATCH.
- La réaction lymphocytaire mixte.

Le recueil des données, établi par une consultation des archives des individus (donneurs) qui s'est présenté au service concernant le typage HLA, nous a permis d'enregistrer toutes les informations nécessaires à notre étude.

Il comprend :

- L'âge
- Le sexe
- Le groupage ABO
- La région
- Les allèles des donneurs

II. Méthodes

II.1. Technique de séparation lymphocytaire sur FICOLL (La lymphocytotoxicité)

II.1.1. Prélèvement sanguin

Le prélèvement se fait au pli du coude à l'aide d'une aiguille de calibre suffisant pour assurer un bon débit. La quantité de sang prélevée (10 ml) est mise dans un herlen contenant des billes en verre, il faut agiter immédiatement pendant 10 min pour faire une défibrination.

Le prélèvement doit se faire en dehors de traitement anti-inflammatoire non stéroïdien (ANS) et de corticoïdes, car ils diminuent l'expression antigénique.

II.1.2. Instruction pour le test

- La plaque de TERASAKI est de forme rectangulaire, menue d'une soixantaine de puits (Cupules) dans lesquelles la solution lymphocytaire et l'immun-sérum sont injectés pour la réalisation de la réaction de lymphocytotoxicité.

- La préparation de la plaque nécessite d'abord un huilage de tous les puits (huile de paraffine) à l'aide d'une pipette calibrée à 3 μ l (pipette pasteur).
- L'huilage de la plaque est nécessaire pour la conservation de produit injecté.
- L'injection des immuns-sérums prélève des savonnettes ayant la même configuration que la plaque test de TERASAKI.
- Mise en congélation des plaques à -80°C .

II.1.3. Séparation des lymphocytes

Les lymphocytes ont été isolés du reste des éléments figurés du sang, puis 2,5 ml de sang de fibrine et 5 ml de PBS (dilution) (**Figure 8**) ont été déposés dans un tube en verre à fond conique. Ce mélange a été déposé sur 4 ml de Ficoll dans 2 tubes (**Figure 9**).



Figure 8: Le mélange lymphocytaire plus PBS sur FICOLL.

Ces deux tubes ont été centrifugés pendant 20 min à 2000 tours/min et à 18°C et récolter par aspiration la couche inter-faciale (à l'aide d'une pipette pasteur). Ne pas aspirer le Ficoll mais seule la couche lymphocytaire.



Figure 9: La formation d'un anneau lymphocytaire.

La suspension recueillie a été mise dans un tube en verre et lavée 2 fois avec du PBS (pour se rassurer qu'il n'y a pas de reste du Ficoll). Après chaque lavage, la suspension sera centrifugée pendant 10 min à 3000 tours /min. Le culot a été remis en suspension et ajusté dans 0,5ml de PBS. La suspension lymphocytaire a été ensuite comptée.

II.1.4. Expression HLA : La lymphocytotoxicité

La plaque TERASAKI a été sortie du congélateur, puis décongelée à température ambiante pendant 10 minutes environ. Ensuite nous avons injecté 1 μ l de la solution lymphocytaire dans chacun des puits (au fond) avec une micro seringue de type Hamilton et laissé incuber 30 min (25-37°C) dans l'étuve.

On a retiré le complément lyophilisé du réfrigérateur et le préparé en ajoutant 1 ml d'eau distillée, puis injecté 5 μ l du complément dans chaque puits.

La solution a été laissée incuber de nouveau pendant une heure et trente minutes (25-37°C). 10 min avant la fin de l'incubation sont préparés l'éosine et le formol tamponné à 7,2 de pH puis les filtrés.

En fin d'incubation, on a injecté 3 μ l de l'éosine au fond de chaque puits de la plaque, après 10 min, injecté 6 μ l de formol tamponné au fond des puits. On a mis une lamelle sur la plaque de TERASAKI et conservé à plus de 4°C jusqu'au lendemain pour faire la lecture (**Figure 9**).

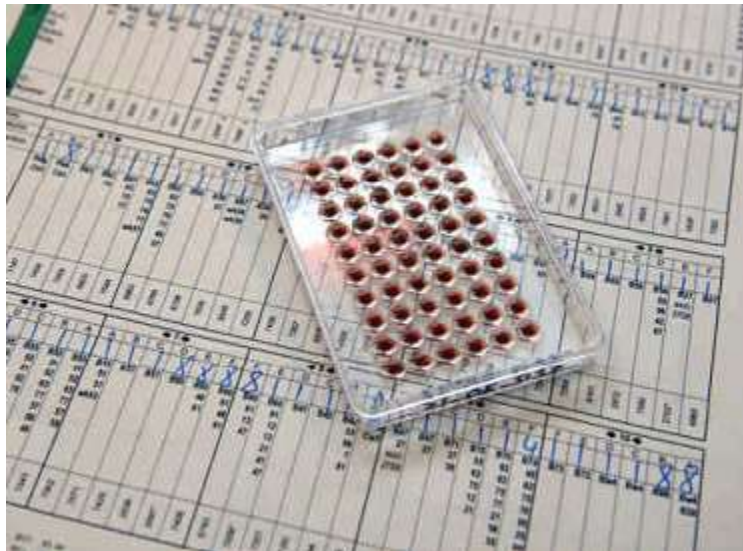


Figure 10: Une plaque de TERASAKI prête pour la lecture.






II.1.5. La lecture

La lecture de la réaction lymphocytaire s'effectue à l'aide du microscope en phase inversée, le principe de la lecture est le suivant :

Elle consiste à démontrer dans les champs microscopiques les lymphocytes morts colorés (réaction positive), ces cellules lysées s'imprègnent de colorant (orange pour l'éosine), alors que les cellules vivantes demeurent réfringentes (réaction négative).

L'appréciation se fait en nombre de choix sur la feuille représentée sous forme d'un plan de plaque micro test de TERAZAKI. La positivité de la réaction est en fonction d'un pourcentage de cellules mortes (colorées) (**Tableau 5**).

Tableau 5: Interprétation de l'observation microscopique de la lymphocytotoxicité.

Cellules mortes %	Score	Observation au microscope
Moins de 10% de cellules colorées.	-	
De 10 à 30% de cellules colorées.	+	
De 30 à 60% de cellules colorées.	++	
De 60 à 80% de cellules colorées.	+++	
De 80 à 100% de cellules colorées.	++++	

-La réaction est positive à 3 et à 4 croix et douteuse à 2 croix.

II.2. Technique du CROSS-MATCH

Le principe de cette technique est le même de celui de la lymphocytotoxicité. C'est une épreuve de compatibilité entre le sérum de receveur et les cellules du donneur ; elle est obtenue comme suit :

Des lymphocytes ont été isolés à partir du sang total du donneur par Ficoll et déposés dans les plaques de TERASAKI, dont le sérum du receveur a été injecté comme suit : 1 µl dans les puits de la 1^{ère} rangée, 2 µl dans la 2^{ème} rangée et 3 µl dans la 3^{ème} rangée, puis l'ajout du complément et du colorant vital comme dans la technique de la lymphocytotoxicité classique et même la lecture sera du même principe (lyse des cellules).

II.3. Technique de séparation lymphocytaire par FluoroBeads (Réaction lymphocytaire mixte)

II.3.1. Principe

Les FluoroBeads B sont des immunomagnétiques de diamètre inférieur à 1 µm, les anticorps monoclonaux anti-CD19 couplés à leur surface sont spécifiques des lymphocytes B.

Les FluoroBeads T portent les anticorps anti-CD2 à leur surface spécifique des lymphocytes T. A partir d'un échantillon de sang, les FluoroBeads fournissent une méthode rapide d'isolement du complexe bille-lymphocyte T ou B à l'aide d'un séparateur magnétique.

II.3.2. Prélèvement

Le prélèvement est réalisé chez le patient en position couchée et à l'aide d'une seringue, après avoir désinfecté l'endroit du prélèvement avec un antiseptique. Mettre la ponction dans l'un des tubes suivants :

-**Anticoagulant Citrate Dextrose (ACD)**: fortement recommande pour l'isolement avec les FluoroBeads. Il permet l'isolement d'un prélèvement de trois jours (les cellules T doivent être isolées dans les 24 heures pour obtenir le meilleur rendement).

- Héparine de sodium : non recommande, isolement dans les 24 heures.

- Héparine de lithium : toxique pour les lymphocytes à ne pas utiliser.

NB : conserver le sang total à température ambiante à l'horizontale pour une meilleure viabilité cellulaire.

II.3.3. Instruction pour le test

Reconstituer les plaques en ajoutant 1 µl d'eau stérilisée et 5 µl d'huile minérale (huile de paraffine) dans chaque puits.

Conserver les plaques reconstituées à 2-5°C et les utiliser dans les 2 heures.

II.3.4. Isolement des cellules T FluoroBeads

Premièrement 2 ml de sang total ont été prélevé dans un tube de 5 ml, le FluoroBeads T (10 secondes) a été vortexé avant l'emploi, puis 100 µl de FluoroBeads T ont été ajouté, une agitation pendant 3 min (20-25°C) par retournement à la main.

2 ml du développeur a été ajouté, bouché et agité 2-3 fois par retournement. Le tube a été placé sur l'aimant (3 min) et le surnageant a été rejeté.

Le tube a été retiré de l'aimant et l'ajout de 1-2 ml de PBS, puis placé sur l'aimant pendant 1 min et le surnageant a été rejeté puis l'étape de lavage a été répétée 2 fois. En fin l'ajout de 100 μ l du milieu nutritif.

II.3.5. Isolement des cellules B FluoroBeads

4 ml de sang total ont été répartis dans un tube de 10 ml, l'ajout de 4 ml de PBS/citrate, puis le mélange par retournement 2-3 fois. Les FluoroBeads B ont été vortexés (10 secondes) avant l'emploi.

Ajout de 100 μ l à l'échantillon (fermer immédiatement le tube) et agitation par retournement à la main pendant 3 à 4 min (20-25°C).

Le tube a été placé sur l'aimant (2 min, ne pas dépasser 3 min) et le surnageant a été éliminé à la pipette, puis retiré de l'aimant. Ces cellules ont été lavées dans 1 à 2 ml de PBS/citrate, puis resuspendus doucement, le tube a été replacé sur l'aimant pendant 1 min. Le surnageant a été éliminé après 2 lavages. Enfin l'ajout de 100 μ l de milieu nutritif.

II.3.6. Estimation

Mettre 1 μ l de la suspension cellulaire dans un puits de la plaque de TERASAKI puis 2 μ l dans le puits suivant. Ajouter 5 μ l de Fluoro Quench, vérifier la concentration cellulaire au microscope à fluorescence inverse.

II.3.7. Reconstitution du complément

1 ml d'eau stérile (2-5°C) a été ajouté dans chaque flacon de complément lyophilisé, puis mélangé doucement jusqu'à la dissolution complète et conservé à 2-5°C jusqu'à l'emploi.

II.3.8. Injection

1 μ l de lymphocytes T ou B a été ajouté dans chaque puits d'une plaque classe I, mélangé avec un mélangeur électronique (vortex), puis l'ajout immédiatement de 1 μ l du complément reconstitué, suivant la plaque utilisée. Ensuite les plaques ont été incubées à température ambiante (20-25°C) pendant 1 heure et colorées par le Fluoro Quench (5 μ l).

II.3.9. Lecture

Les plaques ont été laissées reposer 15 min à plus de 4°C avant la lecture au microscope à fluorescence inversée. La réaction positive montre des cellules mortes fluorescentes colorées en rouge (le bromure d'éthidium ne traverse pas la membrane des cellules intactes, il se lie à l'ADN des cellules mortes et émet la fluorescence rouge). La réaction négative montre des cellules vivantes colorées en vert, l'acridine orange traverse la membrane des cellules intactes, se lie à l'ADN des cellules vivantes et émet la fluorescence verte. Le score des réactions exprime le pourcentage des cellules mortes. Si le témoin négatif contient des cellules mortes, ce pourcentage devra être ajusté en conséquence.

II.3.12. Interprétation

L'interprétation du typage HLA se fait grâce aux plans de batteries indiquant la localisation et la spécificité de sérum (**annexe 2**).

II.4. Analyse statistique

Les fréquences alléliques ont été faites à l'aide de Microsoft Office Excel 2007 et déterminées par rapport aux antigènes exprimés par l'ensemble des patients de notre population. Cela revient à donner en pourcentage le nombre de fois où l'antigène est apparu dans l'échantillon. La comparaison des fréquences entre la population étudiée et les autres populations, a été réalisée à l'aide du logiciel d'analyse statistique XLSTAT 2018 (khideux, valeurs de p). Les valeurs de p inférieures à 0,05 ont été considérées statistiquement significatives.

RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS

III.1. Fréquence des allèles HLA-A et B dans la population de l'Est Algérien

Les fréquences alléliques HLA-A (**Tableau 6**) de notre population montrent que l'allèle A2 est le plus fréquent avec une valeur de 19,06 %, suivie par A9 (17,62 %), A3 (13,52 %), A1 (12,70 %) et A30 (8,61 %). Les allèles HLA- A28, A10, A29, A11 et A33 sont moins fréquents comparativement aux premiers avec des pourcentages respectivement entre (6,76%, 6,35%, 5,12%, 3,69% et 2,66 %). Les autres allèles HLA- A32, A31, A34, A24 et A68 sont moins fréquents avec des valeurs variées respectivement entre (1,64%, 1,43%, 0,41%, 0,2%, 0,2%).

Dans le cas de l'HLA-B (**Tableau 6**) les allèles de plus grandes fréquences selon l'ordre sont HLA- B12 (16,19%), B5 (12,91%), B18 (7,58%), B7 et B16 (6,15%), B21 (5,94%), B49 (5,53%), B35 (5,33%) et B8 (5,12%). Les autres allèles B13, B14, B15, B17, B22, B27, B38, B40, B41, B42, B44, B45, B48, B50, B51, B52, B53, et B70 sont moins fréquents avec des valeurs variées entre 4,92 et 0,20 %.

Tableau 6: Fréquences alléliques des allèles HLA-A et B dans la population de l'Est Algérien.

HLA-A	FA (%)	HLA-B	FA (%)	HLA-B	FA (%)
A1	12,70	B5	12,91	B40	2,87
A2	19,06	B7	6,15	B41	2,05
A3	13,52	B8	5,12	B42	0,20
A9	17,62	B12	16,19	B44	0,61
A10	6,35	B13	0,20	B45	0,61
A11	3,69	B14	4,92	B48	0,41
A24	0,20	B15	3,28	B49	5,53
A28	6,76	B16	6,15	B50	2,46
A29	5,12	B17	4,71	B51	0,20
A30	8,61	B18	7,58	B52	0,20
A31	1,43	B21	5,94	B53	2,66
A32	1,64	B22	0,82	B70	1,43
A33	2,66	B27	1,02		
A34	0,41	B35	5,33		
A68	0,20	B38	0,41		

FA : fréquence allélique

III.2. Fréquence des allèles HLA-A dans différentes régions de l'Est Algérien

Les fréquences des allèles HLA-A étudiées de notre population originaire de différentes wilayas de l'Est Algérienne : Constantine (64 individus), Mila (34 individus), Batna (28 individus), Annaba (22 individus), Jijel (12 individus) et Autres régions (84 individus). Les allèles HLA-A les plus

fréquents dans la wilaya de Constantine sont : HLA-A2 (7,38%) et -A9 (4,92%), Mila HLA-A3 (3,28%) et -A9 (2,25%), Batna HLA-A1 (2,87%), -A9 et A10 (1,64%), Annaba HLA-A9 (2,05%), -A1 et -A3 (1,64%) et à Jijel HLA-A2 (1,84%) et -A9 (1,02%) (**Tableau 7**).

Tableau 7: Fréquences alléliques des allèles HLA-A dans différents régions de la population de l'Est Algérien.

HLA-A	Fréquences alléliques (%)					
	Constantine [64]	Mila [34]	Batna [28]	Annaba [22]	Jijel [12]	Autres région [84]
A1	2,25	1,02	2,87	1,64	0	4,92
A2	7,38	1,84	0,41	0,82	1,84	6,76
A3	3,89	3,28	1,43	1,64	0,61	2,66
A9	4,92	2,25	1,64	2,05	1,02	5,74
A10	1,02	1,23	1,64	0,61	0,61	1,23
A11	0,61	0,41	0,82	0	0,20	1,64
A24	0	0,00	0,00	0	0	0,20
A28	1,23	2,05	0,00	0,61	0	2,87
A29	2,25	0,41	0,82	0,41	0	1,23
A30	1,64	0,41	1,02	0,82	0,20	4,51
A31	0,20	0,41	0,20	0	0	0,61
A32	0,20	0,00	0,41	0	0,41	0,61
A33	0,41	0,61	0,20	0,41	0	1,02
A34	0,00	0,00	0,00	0	0	0,41
A68	0,20	0,00	0,00	0	0	0,00

III.3. Fréquence des allèles HLA-B dans différentes régions de l'Est Algérien

Les fréquences des allèles HLA-B étudiée de notre population originaire de différentes wilaya de l'Est Algérienne qui sont : Constantine (64 individus), Mila (34 individus), Batna (28 individus), Annaba (22 individus), Jijel (12 individus), Autres région (84 individus). Les allèles HLA-B les plus fréquents dans la wilaya de Constantine sont : HLA- B12 (4,51 %) et -B5 (3,07 %), Mila HLA- B5 et B12 avec un pourcentage de 1,43 %, B14, B18 et B49 (1,23 %), Batna HLA- B5 et B12 (0,29 %), B14, B18 et B49 (0,25 %), Annaba HLA- B5, B12 et B14 (1,23 %), B35 (1,02 %) et Jijel HLA -B12 (1,23 %), B5 et B18 (0,82 %) (**Tableau 1**).

Tableau 8: Fréquences alléliques des allèles HLA-B dans différents régions de la population de l'Est Algérien.

HLA-B	Fréquences alléliques (%)					
	Constantine [64]	Mila [34]	Batna [28]	Annaba [22]	Jijel [12]	Autres région [84]
B5	3,07	1,43	0,29	1,23	0,82	4,51
B7	0,82	0,61	0,13	0,61	0,61	3,48
B8	0,82	0,82	0,17	0,82	0	1,43
B12	4,51	1,43	0,29	1,23	1,23	5,74
B13	0,20	0,00	0,00	0,00	0	0
B14	1,23	1,23	0,25	1,23	0,20	0,61
B15	1,43	0	0,00	0,00	0	1,84
B16	1,43	1,02	0,21	0,41	0,82	2,05
B17	0,82	1,02	0,21	0,61	0,41	1,43
B18	2,05	1,23	0,25	0,41	0,41	2,46
B21	2,25	1,02	0,21	0,41	0	2,05
B22	0,41	0	0,00	0,00	0,20	0,20
B27	0,20	0,41	0,08	0,00	0	0,41
B35	1,64	1,02	0,21	1,02	0	1,02
B38	0,41	0	0,00	0,00	0	0
B40	0	0,41	0,08	0,00	0,20	0,61
B41	0,61	0,61	0,13	0,00	0	0,82
B42	0	0	0,00	0,00	0	0,20
B44	0,61	0	0,00	0,00	0	0
B45	0,41	0	0,00	0,00	0	0,20
B48	0	0	0,00	0,00	0	0,20
B49	1,02	1,23	0,25	0,20	0	2,66
B50	0,61	0,41	0,08	0,41	0	1,02
B51	0,20	0	0,00	0,00	0	0
B52	0	0	0,00	0,00	0	0,20
B53	1,02	0	0,00	0,00	0	1,23
B70	0,41	0	0,00	0,41	0	0,00

III.4. Fréquences des haplotypes HLA-AA dans la population de l'Est Algérien

Le pourcentage d'hétérozygoties des haplotypes HLA-A A est 90,78%. Les haplotypes HLA-A A les plus fréquents dans notre population sont : A02 : A02 (6,15 %), A01 : A02 (5,74 %) et A09 : A30 (4,92 %), les autres sont moins fréquents et varient entre 0,41 et 4,51 % (**Tableau9**).

Tableau 9: Les haplotypes HLA-AA rencontrés dans la population de l'Est Algérien.

HLA-A A	FH (%)	HLA-A A	FH (%)	HLA-A A	FH (%)
01:01	2,46	02:30	0,82	09:31	0,41
01:02	5,74	02:31	0,82	09:32	0,41
01:03	2,46	02:32	0,82	09:33	0,82
01:09	4,51	03:03	2,05	10:10	0,41
01:10	1,64	03:09	3,69	10:28	0,41
01:11	0,82	03:10	2,05	10:29	0,41
01:28	0,41	03:11	1,23	10:33	0,82
01:29	0,82	03:28	2,05	11:28	0,41
01:30	1,64	03:29	0,41	11:30	0,82
01:31	0,41	03:30	3,69	28:28	1,23
01:33	1,23	03:31	0,41	28:29	1,64
01:34	0,82	03:32	0,82	28:30	0,82
02:02	6,15	03:33	0,82	28:31	0,41
02:03	4,92	03:68	0,41	28:33	0,82
02:09	4,10	09:09	2,87	29:29	0,82
02:10	3,69	09:10	2,87	29:32	1,23
02:11	2,05	09:11	2,05	30:30	2,05
02:24	0,41	09:28	2,46	30:31	0,41
02:28	1,64	09:29	3,28	33:33	0,41
02:29	0,82	09:30	4,92		

FH : Fréquence Haplotypique.

III.5. Fréquences des haplotypes HLA : B-B dans la population de l'Est Algérien

Un totale de 27 (94,67 %) allèles de l'HLA-B observés sont hétérozygotes. Les haplotypes HLA-B B les plus fréquents dans notre population sont : B05 : B12, B12 : B12 avec des fréquences de 3,69 % et B05 : B35 (2,87 %), les autres sont moins fréquents et varient entre 0,41 et 2,05 % (Tableau 10).

Tableau 10: Les haplotypes HLA : B-B rencontrés dans la population de l'Est Algérien.

HLA:B-B	FH (%)	HLA:B-B	FH (%)	HLA:B-B	FH (%)	HLA:B-B	FH (%)
05 : 05	0,82	08 : 05	0,41	14 : 14	0,41	18 : 38	0,41
05 : 08	0,41	08 : 12	2,05	14 : 16	2,05	18 : 40	0,82
05 : 12	3,69	08 : 14	0,41	14 : 17	0,82	18 : 41	0,82
05 : 14	2,05	08 : 17	1,23	14 : 21	0,82	18 : 49	0,82
05 : 15	1,23	08 : 35	0,41	14 : 27	0,41	18 : 50	1,23
05 : 16	1,64	08 : 40	0,82	14 : 35	1,23	18 : 70	0,41
05 : 17	1,64	08 : 41	1,23	15 : 15	0,41	21 : 17	0,82
05 : 18	2,05	08 : 45	0,41	15 : 16	0,41	21 : 18	1,23
05 : 21	2,46	08 : 49	0,82	15 : 21	0,41	21 : 21	0,82
05 : 22	0,41	08 : 50	0,41	15 : 42	0,41	21 : 27	1,23
05 : 35	2,87	08 : 53	0,82	15 : 49	0,41	22 : 35	0,41
05 : 40	0,41	12 : 05	0,41	15 : 53	0,82	22 : 53	0,41
05 : 41	0,41	12 : 07	0,82	16 : 16	0,41	35 : 35	0,41
05 : 49	1,64	12 : 08	0,82	16 : 18	0,41	35 : 50	1,23
05 : 53	0,41	12 : 12	3,69	16 : 21	0,82	35 : 70	0,41
05 : 70	1,23	12 : 13	0,41	16 : 49	0,82	38 : 45	0,41
07 : 05	0,41	12 : 14	0,82	16 : 53	0,41	40 : 40	0,82
07 : 07	0,82	12 : 16	2,46	16 : 70	0,82	41 : 41	0,41
07 : 12	1,64	12 : 17	1,64	17 : 15	0,41	41 : 53	0,82
07 : 14	0,41	12 : 18	1,64	17 : 18	0,41	44 : 16	0,41
07 : 16	1,23	12 : 21	1,23	17 : 22	0,41	45 : 51	0,41
07 : 17	1,23	12 : 27	0,41	17 : 49	0,41	49 : 15	0,82
07 : 18	1,23	12 : 35	2,05	17 : 50	0,41	49 : 49	1,23
07 : 21	0,41	12 : 40	2,05	18 : 05	0,41	49 : 52	0,41
07 : 35	0,41	12 : 48	0,82	18 : 15	0,82	49 : 53	0,82
07 : 44	0,82	12 : 49	0,41	18 : 18	0,41	53 : 12	0,41
07 : 49	1,23	12 : 50	0,82	18 : 21	0,82		
07 : 50	0,82	12 : 53	0,41	18 : 35	0,82		

FH : fréquence haplotypique.

III.6. Fréquences des haplotypes HLA : A-B dans la population de l'Est Algérien

Plusieurs haplotypes HLA: A-B sont existés dans notre population. Ici dans le **Tableau 11** nous avons mentionnées seulement les haplotypes les plus fréquents qui sont : A02 : B12 et A09 : B12 avec un pourcentage de 4,10 %, suivie par l'haplotype A01 : B05 avec une fréquence de 3,07 %, A2-B5 et A3-B5 (2,46%), A1-B8 (2,25%), A2-B18 et A3-B7 (2,05%), Les autres haplotypes sont moins fréquents et varie entre 0,20 et 1,64 %. La liste complète des haplotypes HLA: A-B est présenté dans l'**Annexe 3**.

Tableau 11: Les haplotypes HLA : A-B les plus fréquemment rencontrés dans la population de l'Est Algérien.

HLA : A-B	FH (%)	HLA: A-B	FH (%)
02 : 12	4,10	03 : 12	1,64
09 : 12	4,10	03 : 35	1,43
01 : 05	3,07	09 : 05	1,43
02 : 05	2,46	09 : 18	1,43
03 : 05	2,46	02 : 15	1,23
01 : 08	2,25	02 : 17	1,23
02 : 18	2,05	02 : 21	1,23
03 : 07	2,05	09 : 49	1,23
01 : 12	1,64	30 : 18	1,23
02 : 07	1,64	30 : 49	1,23

FH : fréquence haplotypique.

DISCUSSION

La distribution des allèles HLA et des haplotypes en Algérie et particulièrement la population du l'Est n'est pas bien définie car elle n'a pas été largement étudiée.

IV.1. Comparaison de fréquence des allèles HLA-A et B avec différents populations

➤ Locus A :

La distribution des antigènes HLA-A chez notre population, comparée aux autres ethnies, a montré deux types de résultats : significatifs ($P < 0,05$; La valeur observable de χ^2 supérieure à la valeur de χ^2 critique) représentés par toutes les allèles mentionnés dans le **Tableau 12** sauf les deux allèles A33 ($P = 0,806$) et A34 ($P = 0,110$) qui représentent un résultat non significatif ($P > 0,05$; La valeur observable de khideux inférieure à la valeur critique).

L'allèle A2 rencontré avec une fréquence élevée chez toutes les populations et également significativement représenté dans la population tunisienne (35,77 %) (*Hmida et al., 1995*). Cette fréquence élevée de l'allèle A2 dans notre population est également rapportée par Kabbaj *et al* 2010. Ainsi que les allèles A1 et A3 rencontrent également une fréquence élevée et presque égales chez la population Marocaine (10 %) (*Brick et al., 2006*), Arabie Saoudite (7 %, 7,2%) (*Patiroğlu et Akar, 2016*), et la France (10,9 %, 10,8 %) (*Pedron et al., 2005*).

Les allèles A10, A28 qui présentent des fréquences respectivement de 6,35 %, 6,76 % dans notre série, sont observés avec des fréquences de 9,76 %, 16,26 % chez la population Tunisienne (*Hmida et al., 1995*). Ces deux allèles n'ont été retrouvés chez aucune des autres populations. Contrairement aux allèles A23, A26 qui n'ont pas été observés chez notre population. Cependant A23 rapporte des fréquences de 8,13 %, 6,80 %, 7,10 % respectivement chez les Tunisiennes (*Hmida et al., 1995*), les Marocaines (*Brick et al., 2006*) et les Turquies (*Osman et al., 2014*), et qui reste toujours faible à celles des populations Saoudienne (*Patiroğlu et Akar, 2016*) et françaises (*Pedron et al., 2005*) (3,90 %, 4,40 %) ainsi que l'allèle A26 qui présente une faible fréquence chez toutes les autres populations (entre 1 et 3,6 %) comparés à celle de l'Arabie Saoudite (7,40 %) (*Patiroğlu et Akar, 2016*).

Les allèles A24, A30, et A32 présentent des pourcentages plus élevés chez les tunisiennes (16,26 %, 15,45 %, 11,38 %) (*Hmida et al., 1995*) par rapport à notre population (0,20 %, 8,61 %, 1,64 %) respectivement. Ainsi que l'allèle A68 est plus fréquent dans l'Arabie Saoudite (10,10 %) (*Patiroğlu et Akar, 2016*) contrairement aux autres populations.

Il y'a une fréquence de 17,62 % pour l'allèle A9 dans notre population, et n'a pas été observé chez les autres populations. Cela signifie qu'il y'a une spécificité de notre population.

Tableau 12: Fréquences alléliques des allèles HLA-A dans différentes populations (*Hmida et al., 1995 ; Pedron et al., 2005 ; Brick et al., 2006 ; Osman et al., 2014 ; Patiroğlu et Akar, 2016*).

Fréquence allélique (%)

HLA-A	Présente étude (n=244)	Tunisie (n=123)	Maroc (n=110)	Turque (n=126)	Saoudie (n=491)	France (n=356)	χ^2	P value
A1	12,70	26,02	10,00	11,50	7,00	10,90	82,419	< 0,0001
A2	19,06	35,77	19,1	18,70	28,90	24,70	29,509	< 0,0001
A3	13,52	12,20	10,00	9,10	7,20	10,80	62,795	< 0,0001
A10	6,35	9,76	0,00	0,00	0,00	0,00	138,986	< 0,0001
A11	3,69	10,57	3,60	6,30	2,40	6,20	31,438	< 0,0001
A23	0,00	8,13	6,80	7,10	3,90	4,40	43,418	< 0,0001
A24	0,20	16,26	6,80	9,00	8,00	10,00	137,262	< 0,0001
A26	0,00	1,00	3,60	3,60	7,40	3,00	31,037	< 0,0001
A28	6,76	16,26	0,00	0,00	0,00	0,00	179,736	< 0,0001
A29	5,12	8,13	4,10	3,60	3,20	5,10	18,692	0,002
A30	8,61	15,45	7,70	2,40	4,50	6,10	53,338	< 0,0001
A31	1,43	2,44	2,70	1,60	6,60	1,90	13,983	0,016
A32	1,64	11,38	4,10	2,80	3,70	2,60	26,514	< 0,0001
A33	2,66	4,07	5,00	4,00	5,00	4,40	2,299	0,806
A34	0,41	0,00	1,40	0,00	0,10	0,80	8,975	0,110
A68	0,20	0,00	4,60	8,30	10,10	4,80	56,164	< 0,0001

➤ **Locus B :**

La distribution des antigènes HLA-B chez notre population, comparée aux autres ethnies (**Tableau 13**), a montré deux types de résultats : significatifs ($P < 0,05$ ainsi La valeur observable de khideux inférieure à la valeur critique) représentés par les allèles B8 ($P = 0,044$), B13 ($P < 0,0001$), B14 ($P < 0,0001$), B15 ($P < 0,0001$), B16 ($P < 0,0001$), B17 ($P < 0,0001$), B18 ($P < 0,0001$), B22 ($P < 0,0001$), B35 ($P < 0,0001$), B40 ($P < 0,0001$), B41 ($P = 0,004$), B44 ($P < 0,0001$), B45 ($P = 0,00$), B47 ($P = 0,001$), B49 ($P < 0,0001$), B50 ($P < 0,0001$), B51 ($P < 0,0001$), B52 ($P < 0,0001$), non significatifs ($P > 0,05$; la valeur observable de khideux supérieure à la valeur critique) représentés par les allèles B7 ($P = 0,461$), B27 ($P = 0,340$), B37 ($P = 0,403$), B38 ($P = 0,276$), B39 ($P = 0,187$), B42 ($P = 0,064$), B48 ($P = 0,083$), B53 ($P = 0,058$).

L'allèle B8 présente une fréquence plus élevés chez les tunisiennes et les Saoudiennes (13,01 %, 10 %) (*Hmida et al., 1995 et Osman et al., 2014*) par rapport aux autres pays (entre 4,60 et 6,70 %).

Les allèles B16, B17, B22 qui présentent des fréquences respectivement de 6,15 %, 4,71 %, 0,82 % dans notre série, sont observés avec des fréquences de 4,07 %, 12,2 %, 4,07 % chez la population Tunisienne (*Hmida et al., 1995*). Ces deux allèles n'ont été retrouvés chez aucune des autres populations ou retrouvés de fréquence plus faible B17 (1,1 %), B22 (1,7 %) chez les Turcs (*Patiroğlu et Akar, 2016*).

Les allèles B13, B14, B15, B40 sont nuls dans la France (*Pedron et al., 2005*). Mais présentés de fréquences différentes chez les autres populations ce qui indique la spécificité de ces allèles dans les pays Arabes et la Turquie.

Les allèles B44, B52 présentent des pourcentages plus élevés chez les tunisiennes (21,95 %, 10,57 %) (*Hmida et al., 1995*) par rapport à notre population (0,61 %, 0,20 %) respectivement. Ainsi que les allèles B50, B51 sont plus fréquent dans l'Arabie Saoudite (16,30 %, 19,30 %) (*Osman et al., 2014*) a comparé aux autres pays.

Les allèles B5, B12, et B21 (12,91 %, 16,19 %, et 5,94 %) sont observés plus fréquemment dans notre échantillon et sont manquants dans les autres populations ces allèles semblent donc plus particulièrement caractériser la population Algérienne. Cependant *Kabbaj et al 2010* rapportent une fréquence de 1,02 % de l'allèle B12 qui reste toujours faible comparée à notre population.

Tableau 13: Fréquences alléliques des allèles HLA-B dans différentes populations (*Hmida et al., 1995 ; Pedron et al., 2005 ; Brick et al., 2006 ; Osman et al., 2014 ; Patiroğlu et Akar, 2016*).

HLA-B	Fréquence allélique (%)						χ^2	P value
	Présente étude (n=244)	Tunisie (n=123)	Maroc (n=110)	Turquie (n=126)	Saoudie (n=491)	France (n=356)		
B7	6,15	9,76	7,70	4,40	8,10	9,40	4,644	0,461
B8	5,12	13,01	4,60	5,30	10,00	6,70	11,387	0,044
B13	0,20	8,94	0,90	8,30	1,40	0,00	130,002	< 0,0001
B14	4,92	8,94	3,60	2,80	2,00	0,00	55,518	< 0,0001
B15	3,28	2,44	6,80	3,30	4,80	0,00	46,150	< 0,0001
B16	6,15	4,07	0,00	0,00	0,00	0,00	128,758	< 0,0001
B17	4,71	12,2	0,00	1,10	0,00	0,00	117,302	< 0,0001
B18	7,58	5,69	6,80	5,20	2,00	5,10	50,942	< 0,0001
B22	0,82	4,07	0,00	1,70	0,00	0,00	35,431	< 0,0001
B27	1,02	2,44	2,70	2,40	1,80	3,80	5,664	0,340
B35	5,33	17,07	6,40	19,80	7,00	11,10	106,155	< 0,0001
B37	0,00	0,81	1,80	0,00	0,80	1,10	5,109	0,403
B38	0,41	0,00	3,60	0,80	1,80	2,60	6,328	0,276
B39	0,00	0,00	0,90	1,20	1,90	2,00	7,479	0,187
B40	2,87	9,76	0,90	7,10	1,50	0,00	85,645	< 0,0001
B41	2,05	8,13	5,00	2,80	3,40	1,30	17,519	0,004
B42	0,20	3,25	0,90	0,00	1,00	1,10	10,442	0,064
B44	0,61	21,95	9,60	5,60	2,10	11,70	100,855	< 0,0001
B45	0,61	5,69	5,50	1,70	0,60	2,70	22,549	0,000
B47	0,00	0,00	2,30	0,00	0,30	0,20	19,838	0,001
B48	0,41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	9,727	0,083
B49	5,53	9,76	2,70	4,40	1,50	3,10	49,848	< 0,0001
B50	2,46	13,82	5,00	4,80	16,30	2,30	62,590	< 0,0001
B51	0,20	9,76	4,10	11,10	19,30	6,90	84,916	< 0,0001
B52	0,20	10,57	2,30	2,80	2,20	2,10	44,915	< 0,0001
B53	2,66	4,07	1,80	0,00	3,50	2,20	10,669	0,058

IV.2. Comparaison des fréquences haplotypiques HLA : A-B avec différents populations

La comparaison des haplotypes (A: B) observés (**Tableau 14**) dans notre population de l'Est algérienne avec les autres populations (tunisienne, marocain, turc, saoudite et française) pour HLA classe I révèlent que :

La plupart des haplotypes présentes des différences significatives comme (A01B07, A01B08, A02B07, A02B15, A02B18, A02B21, A02B53, A02B44, A02B50, A02B51, A03B07, A03B21, A03B35, A24B35, A30B18, A30B21, A30B53) avec des valeurs de p value < 0,05 et de

$\chi^2_{\text{observé}} > \chi^2_{\text{critique}}$, sachant que $\chi^2_{\text{critique}} = 11,070$. Alors que les haplotypes (A02B08 et A11B35) ne montrent aucune différence significative.

Les haplotypes A01B07, A01B08, A02B07, A02B08 sont présent chez notre population respectivement à 1,02%, 2,25%, 1,64%, 0,61% chez la population française 0,30%, 2,48%, 1,21%, 0,75% (*Pedron et al., 2005*), et chez la population marocaine 1,14%, 1,59%, 1,14% (*Brick et al., 2006*) sauf l'haplotype A01B08, mais tout absent chez la population tunisienne (*Hmida et al., 1995*) et modérément exprimé chez les saoudiennes (*Osman et al., 2014*) et les turcs (*Patiroğlu et Akar., 2016*). Aussi les haplotypes A02B15, A02B18, A02B21, A02B35 sont présent chez notre population respectivement 1,23%, 2,05%, 1,23%, 0,61%, aussi chez les marocaine 1,36%, 1,59%, 1,36% à l'exception de l'haplotype A02B21 (*Brick et al., 2006*) mais tout absent chez la population saoudiennes (*Osman et al., 2014*) et modérément exprimé chez la population tunisienne (*Hmida et al., 1995*), les turcs (*Patiroğlu et Akar, 2016*) et les français (*Pedron et al., 2005*). Alors que les haplotypes A02B44, A02B50, A02B51, A24B35, A30B53 sont absent dans notre population et présent chez les autres (*Hmida et al., 1995 ; Pedron et al., 2005 ; Brick et al., 2006 ; Osman et al., 2014 ; Patiroğlu et Akar, 2016*).

Tous Les haplotypes A03B07, A03B21, A03B35, A11B35, A30B18, A30B21 sont présentés dans notre population 2,05%, 1,23%, 1,43%, 0,41%, 1,23%, 1,02% respectivement suivie par la population Française (*Pedron et al., 2005*), et sont présentes / absentes chez les tunisiennes, marocaines et les turcs (*Hmida et al., 1995 ; Brick et al., 2006 ; Patiroğlu et Akar, 2016*). Ainsi absentes chez la population Saoudienne.

Tableau 14: Les haplotypes HLA : A-B les plus fréquemment rencontrés dans la population de l'Est Algérien et les autres populations (*Hmida et al., 1995 ; Pedron et al., 2005 ; Brick et al., 2006 ; Osman et al., 2014 ; Patroğlu et Akar, 2016*).

HLA-AB	Fréquence Haplotypique (%)						χ^2	P value
	Est Algérien (n=244)	Tunisie (n=102)	Maroc (n=110)	Turquie (n=126)	Saoudie (n=491)	France (n=356)		
A01 B07	1,02	0,00	1,14	0,00	0,00	0,30	16,426	0,006
A01A08	2,25	0,00	0,00	3,20	0,00	2,48	27,090	< 0,0001
A02B07	1,64	0,00	1,59	0,00	4,21	1,21	16,094	0,006
A02B08	0,61	0,00	1,14	2,40	0,00	0,75	10,463	0,063
A02B15	1,23	0,00	1,36	0,00	0,00	0,00	25,098	0,00
A02B18	2,05	0,00	1,59	0,00	0,00	0,30	36,690	< 0,0001
A02B21	1,23	1,86	0,00	0,00	0,00	0,00	25,502	0,00
A02B35	0,61	0,00	1,36	2,40	0,00	0,00	17,051	0,004
A02B44	0,00	2,00	1,14	2,40	0,00	1,95	15,432	0,009
A02B50	0,00	0,00	1,59	0,80	7,35	0,45	54,496	< 0,0001
A02B51	0,00	0,00	1,14	0,80	6,41	0,76	44,491	< 0,0001
A03B07	2,05	0,00	0,00	0,00	0,00	1,66	29,971	< 0,0001
A03B21	1,23	2,60	0,00	0,00	0,00	0,00	28,616	< 0,0001
A03B35	1,43	0,00	0,00	3,20	0,00	0,68	24,491	0,00
A11B35	0,41	2,35	0,00	0,00	0,00	0,60	9,962	0,076
A24B35	0,00	0,00	1,14	1,60	1,79	0,00	12,614	0,027
A30B18	1,23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,45	20,476	0,001
A30B21	1,02	1,80	0,00	0,00	0,00	0,00	22,030	0,001
A30B53	0,00	1,93	0,00	0,00	1,02	0,00	11,456	0,043

CONCLUSION

Le système HLA est le système génétique le plus polymorphe. C'est un marqueur individuel du soi, dont son rôle fonctionnel est de mieux en mieux compris à l'aide de ses diverses approches : sérologique, cellulaire, moléculaire, structurale et génomique forment un tout dont la finalité est de préciser les épitopes réellement impliqués dans le fonctionnement du système immunitaire mais aussi leur rôle non immunologique (*Fauchet, 1989*).

Nos résultats déterminent le grand polymorphisme du système HLA classe I dans notre population de l'Est algérienne, dont les fréquences alléliques (HLA-A / HLA-B) et haplotypiques (HLA-A:A / B:B / A:B) sont déterminées, cela nous a permis de conclure que les allèles HLA-A2 (19,06%), A9 (17,62%), A3 (13,52%), A1 (12,70%) sont les plus fréquents pour le locus HLA-A. Les allèles HLA-B12 (16,19%), B5 (12,91%), B18 (7,58%), B7 et B16 (6,15%) sont les plus fréquents pour le locus HLA-B. Un pourcentage d'hétérozygotie des allèles HLA-A est (90,78%) et des allèles HLA-B est (94,67%) ce qui confirme le grand polymorphisme de ce système chez notre population d'étude. Les haplotypes HLA-A:B les plus fréquents sont HLA : A2-B12 et A9-B12 (4,10%) ainsi A1-B5 (3,07%).

Le système HLA est un outil génétique important pour les études anthropologiques et ancestrales et dans la recherche des variations génétiques humaines et des origines des peuples (*Retima et al., 2017*). La comparaison de nos résultats avec les résultats des autres ethnies à l'aide des valeurs du test χ^2 et P value nous a permis de conclure que la population tunisienne est la population la plus proche à notre population ainsi la population française et turc.

L'intérêt du système HLA en pratique réside dans son implication majeure dans la greffe d'organe, la relation avec certaines situations pathologiques et maladies associées à HLA ou à un allèle particulier. Au futur, nous souhaitons lancer un programme national de typage HLA pour les donateurs volontaires des organes en Algérie, en collaboration avec l'Association Algérienne du don d'organes, de tissus et de cellules pour la transplantation **Biloba** (ADOB), afin de fournir plus de chances de trouver des donateurs HLA-identiques non apparentés aux patients transplantés.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Agrawal S., Srivestava S. et Tripahti T. (2007).** Role of humain leucocyte antigens in studying population diversity. *Antropology today*, 3, 11: 355-365.
- Béné M-C., Bahram S. et Labalette M. (2013).** Immunologie fondamentale et immunopathologie. Ed, Elsevier Masson SAS. PP: 23-25-26.
- Bennani N., Atouf O., Benseffaj N., Brick C. et Essakalli M. (2009).** Polymorphisme HLA et maladie de Behçet dans la population marocaine: HLA polymorphism and Behçet's disease in Moroccan population. *Pathologie Biologie*, 57, 7 : 403–409.
- Bergereau E. (2010).** Rôle des LT-CD8+ dans l'auto-immunité du SNC: influence des autres effecteurs de l'immunité adaptative. p: 246.
- Brick C., Atouf O. et Essakalli M. (2015).** Le système HLA dans la population marocaine : revue générale. *Transfusion Clinique et Biologique*, 13 : 1-13.
- Brick C., Bennani N., Atouf O. et Essakalli M. (2006).** HLA-A, -B, -DR and -DQ allele and haplotype frequencies in the Moroccan population: a general population study. *Transfusion Clinique et Biologique*, 13, 7 : 346-352.
- Burmester G-R. et Pezzutto A. (2000).** Atlas de poche d'immunologie. Bases, analyses biologiques, pathologies. Ed, Médecine-Science Flammarion. Paris. PP: 316
- Carosella D-E. (2015).** La découverte du système HLA par le Professeur Jean DAUSSET. Prix Nobel de médecine. Institut de France : académie des sciences. 3 : 1-3.
- Cesbron-Gautier A., Simon P., Achard L., Cury S., Follea G. et Bignon J-D. (2004).** Technologie Luminex : application aux typages HLA par biologie moléculaire (PCR-SSO) et à l'identification des anticorps anti-HLA. *Annales Biologie Clinique*, 62, 6 : 93-98.
- Charron D. (2012).** Du HLA à la thérapie cellulaire. *La Revue de médecine interne*, 33, 2: 62–63.
- Chatenoud L. et François J. (2008).** Immunologie 5^{ème} édition. Ed, Médecine-Sciences Flammarion, Paris, PP : 86-87-91-92.
- Espinosa E. et Chillet P. (2006).** Immunologie, Ed, Ellipses, paris, PP: 167.
- Fauchet R. (1989).** Introduction au CMH (classe I/classe II) Méthodes d'étude, *Annales de Recherches Vétérinaires*, 20 : 329-335.

- Ferrer A., Fernández M-E. et Nazabal M. (2005).** Overview on HLA and DNA typing methods. *Biotechnología Aplicada*, 22, 11 : 91-101.
- Georges B. (1999).** Influence du ligand peptidique sur la conformation et la stabilité des molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II. P: 189.
- Giannoli C., Nguyen T-K-T. et Dubois V. (2011).** HLA et transfusion : nouvelles approches à l'ère du Luminex™. *Transfusion Clinique et Biologique*, 18, 6 : 218-223.
- Hmida S., Mojaat N., Abid S., Dridi A., Genetet B., Boukef K. et Semana G. (1995).** Etude du polymorphisme HLA de classe I dans la population tunisienne. *TCB*, 5 : 381-386.
- Jacques A. (2015).** Intérêt du séquençage dans les typages HLA et la greffe de cellules souches hématopoïétiques. P : 137.
- Kabbaj M., Oudghiri M., Naya A., Naamane N., El Turk J., Bennani S. et Hassar M. (2010).** HLA-A, -B, -DRB1 alleles and haplotypes frequencies in Moroccan patients with leukemia. *Annles de Biologie Clinique*, 68, 5: 291-6.
- Kamoun A., Mahfoudh N., Frigui M., Bahloul Z. et Makni H. (2012).** Etude d'association des antigènes HLA classe I avec la maladie de Behcet dans le Sud tunisien. *Pathologie Biologie*, 60, 6 : 59-64.
- Kleinclauss F., Frontcza A., Terrier N., Thuret R. et Timsit M-O. (2016).** Aspects immunologiques et immunosuppression en transplantation rénale, transplantations rénales ABO et HLA-incompatibles. *Progrès en urologie*, 16 : 1-16.
- Male D. (2015).** Immunologie-Aide-mémoire illustré. Ed, De Boeck. 4^{ème} édition. PP: 140
- Marsh S-G-E., Albert E.D., Bodmer W.F., Bontrop R.E., Dupont B. et al. (2010).** Nomenclature for factors of the HLA system. *Tissue Antigens*, 75: 291-455.
- Marsh S-G-E., Parham p. et Barber L-D. (2000).** The HLA facts book. Ed, Academic press (AP), Californie, PP: 413.
- Moalic V. (2008).** Comment est réalisé un typage HLA ?. *Réanimation*, 17: 407-411.
- Moalic V. et Ferec C. (2005).** Typage HLA, méthodes d'analyses et applications cliniques. *Presse Médicale*, 34, 8 : 1101-1108.
- Nydegger U. (2009).** Le système HLA: découverte et essor important. *Pipette*, 30, 1:1-1.

- Ohno S, Ohguchi M, Hirose S, Matsuda H, Wakisaka A, Aizawa M. (1982).** Close association of HLA-Bw51 with Behçet's disease, *Archet Ophthalmology*, 100, 13 :1455–1468.
- Osman A-E. et al., (2014).** HLA-A, -B, -C, -DRB1, and -DQB1 Allele Lineages and Haplotype Frequencies among Saudis. *Immunology and Immunogenetics Insights*. 6: 1–6.
- Patiroğlu T. et Akar H-H. (2016).** The Frequency of HLA-A, HLA-B, and HLA-DRB1 Alleles in Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia in the Turkish Population: A Case-Control Study. *Turkish Journal of Hematology*, 33, 7: 339-345.
- Pedron B. et al. (2005).** Listing of Common HLA Alleles and Haplotypes Based on the Study of 356 Families Residing in the Paris, France, Area: Implications for Unrelated Hematopoietic Stem Cell Donor Selection. *Human Immunology*, 66, 11 : 721–731.
- Raache R., Hennachi R., Amroune H., Heniche A., Belanteur K., Benyahia A. et al. (2013).** Gènes de susceptibilité HLA et rétinopathie diabétique chez la population algérienne. *Journal français d'ophtalmologie*, 36, 8 : 247—254.
- Retima A., Bouzenda K. et Ouelaa H. (2017).** Fréquences alléliques HLA : détermination sur une population d'Annaba. *Transfusion Clinique et Biologique*, 24, 1 : 57.
- Revillard J-P. (2001).** Immunologie. Ed, De Boeck, 4ème édition. PP : 48.
- Santolaria T. (2009).** Induction de tolérance aux allogreffes d'organes solides par les lymphocytes T régulateurs CD4+ CD25+ FOXP3+. P:168.
- Semana G. et Quelvenec E. (2002).** Exploration du système HLA : pratiques et indications. *Revue Française des Laboratoires*, 341, 10 : 53-62.
- Seydou gaoh H. (2006).** Variabilité génétique du système HLA après stimulation par des épitopes du VIH-1. P : 130.
- Talpin A. (2013).** Complexe majeur d'histocompatibilité et génomique fonctionnelle dans les spondylarthrites. P: 231.
- The MHC sequencing consortium. (1999).** Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex, *Nature*, 401, 3 : 921-923.
- Sites web :**
<http://hla.alleles.org/nomenclature/index.html>

ANNEXES

Annexe 1 : Liste de toutes les spécificités HLA reconnues sérologiques et cellulaires.

HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-D	HLA-DR	HLA-DQ	HLA-DP
A1	B5	Cw1	Dw1	DR1	DQ1	DPw1
A2	B7	Cw2	Dw2	DR103	DQ2	DPw2
A203	B703	Cw3	Dw3	DR2	DQ3	DPw3
A2010	B8	Cw4	Dw4	DR3	DQ4	DPw4
A9	B12	Cw5	Dw5	DR4	DQ5 (1)	DPw5
A10	B13	Cw6	Dw6	DR5	DQ6 (1)	DPw6
A11	B14	Cw7	Dw7	DR6	DQ7 (3)	
A19	B15	Cw8	Dw8	DR7	DQ8 (3)	
A23 (9)	B16	Cw9 (w3)	Dw9	DR8	DQ9 (3)	
A24 (9)	B17	Cw10 (3)	Dw10	DR9		
A2403	B18		Dw11 (w7)	DR10		
A25 (10)	B21		Dw12	DR11 (5)		
A26 (10)	B22		Dw13	DR12 (5)		
A28	B27		Dw14	DR13 (6)		
A29 (19)	B2708		Dw15	DR14 (6)		
A30 (19)	B35		Dw16	DR1403		
A31 (19)	B37		Dw17 (w7)	DR1404		
A32 (19)	B38 (16)		Dw18 (w6)	DR15 (2)		
A33 (19)	B39 (16)		Dw19 (w6)	DR16 (2)		
A34 (10)	B3901		Dw20	DR17 (3)		
A36	B3902		Dw21	DR18 (3)		
A43	B40		Dw22	DR51		
A66 (10)	B4005		Dw23	DR52		
A68 (28)	B41		Dw24	DR53		
A69 (28)	B42		Dw25			
A74 (19)	B44 (12)		Dw26			
A80	B45 (12)					
	B46					
	B47					
	B48					
	B49 (21)					
	B50 (21)					
	B51 (5)					
	B5102					
	B5103					
	B52 (5)					
	B53					
	B54 (22)					
	B55 (22)					
	B56 (22)					
	B57 (17)					
	B58 (17)					
	B59					
	B60 (40)					
	B61(40)					
	B62 (15)					
	B63 (15)					
	B64 (14)					

B65 (14)

B67

B70

B71 (70)

B72 (70)

B73

B75 (15)

B76 (15)

B77 (15)

B78

B81

B82

Bw4

Bw6

Annexe 2 : Modèle d'une batterie utilisée pour l'identification des antigènes HLA-A et HLA-B.

	A	B	C	D	E	F
1	T+	T-	A1	A1 36	A2	A2 69
2	A10- 34-66	A24	A23	A9 80	A3	A3
3	A25	A26	A11	A11	A28	A28 33-34- 11
4	A32 25	A31	*A30 31-74	A30	A29 B41	A 29
5	A32	A33	A29-31- 32-33-66- 74	A34	B5 78	B51
6	B12	B8 59	B8	B7-42 81	B7	B52 49
7	B44	B45	B13	B13	B14	B14
8	B39	B16 14	B38	*B63 49-5	B62	B15-46 57
9	B17	B17 73	B18	B18	B21 56	B21
10	B27 47	B37	B56	B22 42-67	B55	B49 53 77
11	B27	B35 53	B35	B40 47	B40 48	B60 48
12	BW6	BW4	B70-62-75	B70-62-50- 75-45	B42	B41

NOM
PRENOM
RESULTAT

A - A / B - B

TECHNIQUE :
LECTURE :

DATE : / / 2018
Lot Eurobio N° CT M 4

	A	B	C	D	E	F
1	T+	T-	A1	A1 36	A2	A2 69
2	A10- 34-66	A24	A23	A9 80	A3	A3
3	A25	A26	A11	A11	A28	A28 33-34- 11
4	A32 25	A31	*A30 31-74	A30	A29 B41	A29
5	A32	A33	A29-31- 32-33-66- 74	A34	B5 78	B51
6	B12	B8 59	B8	B7-42 81	B7	B52 49
7	B44	B45	B13	B13	B14	B14
8	B39	B16 14	B38	*B63 49-5	B62	B15-46 57
9	B17	B17 73	B18	B18	B21 56	B21
10	B27 47	B37	B56	B22 42-67	B55	B49 53-77
11	B27	B35 53	B35	B40 47	B40 48	B60 48
12	BW6	BW4	B70-62- 75	B70-62- 50-75- 45	B42	B41

NOM
PRENOM
RESULTAT

A - A / B - B

TECHNIQUE :
LECTURE :

DATE : / / 2018
Lot Eurobio N° CT M 4

	A	B	C	D	E	F
1	T+	T-	A1	A1 36	A2	A2 69
2	A10- 34-66	A24	A23	A9 80	A3	A3
3	A25	A26	A11	A11	A28	A28 33-34- 11
4	A32 25	A31	*A30 31-74	A30	A29 B41	A 29
5	A32	A33	A29-31- 32 33 66- 74	A34	B5 78	B51
6	B12	B8 59	B8	B7-42 81	B7	B52 49
7	B44	B45	B13	B13	B14	B14
8	B39	B16 14	B38	*B63 49-5	B62	B15-46 57
9	B17	B17 73	B18	B18	B21 56	B21
10	B27 47	B37	B56	B22 42-67	B55	0
11	B27	B35 53	B35	B40 47	B40 48	
12	BW6	BW4	B70-62 75	B70-62 50 75-45	B42	B41

NOM
PRENOM
RESULTAT

A - A / B - B

TECHNIQUE :
LECTURE :

DATE : / / 2017
Lot Eurobio N° CT k4

	A	B	C	D	E	F
1	T+	T-	A1	A1 36	A2	A2 69
2	A30- 34-66	A24	A23	A9 80	A3	A3
3	A25	A26	A11	A11	A28	A28 33-34- 11
4	A32 25	A31	*A30 31 74	A30	A29 B41	A29
5	A32	A33	A29-31- 32-33-66- 74	A34	B5 78	B51
6	B12	B8 59	B8	B7-42 81	B7	B52 49
7	B44	B45	B13	B13	B14	B14
8	B39	B16 14	B38	*B63 49-5	B62	B15- 46 57
9	B17	B17 73	B18	B18	B21 56	B21
10	B27 47	B37	B56	B22 42-67	B55	B49 53-77
11	B27	B35 53	B35	B40 47	B40 48	B60 48
12	BW6	BW4	B70-62 75	B70-62 50-75- 45	B42	B41

NOM
PRENOM
RESULTAT

A - A / B - B

TECHNIQUE :
LECTURE :

DATE : / / 2017
Lot Eurobio N° CT k4

Annexe 3 : liste complète des haplotypes HLA-AB de la population de l'Est Algérien avec leurs fréquences.

HLA-AB	FH (%)	HLA-AB	FH (%)	HLA-AB	FH (%)	HLA-AB	FH (%)
01 :05	3,07	03 :35	1,43	11:14	0,20	30 :14	0,20
01 :07	1,02	03 :41	0,20	11 :16	0,41	30 :16	0,20
01 :08	2,25	03 :45	0,41	11 :17	0,20	30 :17	0,20
01 :12	1,64	03 :49	0,61	11 :22	0,20	30 :18	1,23
01 :14	0,41	03 :50	0,20	11 :40	0,41	30 :21	1,02
01 :15	0,61	03 :53	0,20	11 :35	0,41	30 :22	0,20
01 :16	0,20	09 :05	1,43	11 :48	0,20	30 :27	0,20
01 :17	0,61	09 :07	0,41	11 :49	0,20	30 :35	0,61
01 :18	0,41	09 :08	1,43	24 :15	0,20	30 :38	0,20
01 :21	0,41	09 :12	4,10	28 :05	0,61	30 :41	0,20
01 :38	0,20	09 :14	1,43	28 :07	0,20	30 :44	0,41
01 :40	0,82	09 :15	0,41	28 :12	0,61	30 :49	1,23
01 :41	0,20	09 :16	1,23	28 :14	0,61	30 :50	0,20
01 :49	0,82	09 :17	0,82	28 :15	0,61	30 :70	0,41
02 :05	2,46	09 :18	1,43	28 :16	0,61	31 :05	0,20
02 :07	1,64	09 :21	1,23	28 :17	0,41	31 :07	0,20
02 :08	0,61	09 :22	0,41	28 :18	0,41	31 :15	0,41
02 :12	4,10	09 :27	0,41	28 :21	0,20	31 :17	0,41
02 :14	0,61	09 :35	0,61	28 :35	0,41	31 :40	0,20
02 :15	1,23	09 :48	0,20	28 :42	0,20	32 :05	0,20
02 :16	1,02	09 :49	1,23	28 :44	0,20	32 :12	0,41
02 :17	1,23	09 :50	0,20	28 :49	0,20	32 :16	0,20
02 :18	2,05	09 :53	0,61	28 :50	0,61	32 :35	0,20
02 :21	1,23	10 :05	0,61	28 :53	0,82	32 :40	0,41
02 :27	0,20	10 :07	0,41	29 :05	0,61	32 :70	0,20
02 :35	0,61	10 :08	0,20	29 :12	1,02	33 :07	0,20
02 :41	0,61	10 :12	0,41	29 :16	0,41	33 :12	0,41
02 :49	0,82	10 :14	0,20	29 :18	0,41	33 :14	0,20
02 :52	0,20	10 :16	0,61	29 :27	0,20	33 :16	0,61
02 :70	0,41	10 :17	0,20	29 :35	0,61	33 :17	0,20
03 :05	2,46	10 :18	0,61	29 :40	0,61	33 :18	0,20
03 :07	2,05	10 :21	0,61	29 :41	0,20	33 :35	0,41
03 :08	0,41	10 :40	0,41	29 :49	0,20	33 :49	0,20
03 :12	1,64	10 :41	0,61	29 :50	0,41	33 :50	0,20
03 :14	1,02	10 :50	0,41	29 :53	0,41	34 :12	0,20
03 :16	0,61	10 :53	0,61	30 :05	0,82	34 :45	0,20
03 :17	0,41	10 :70	0,41	30 :08	0,41	68 :51	0,20
03 :18	0,61	11 :05	0,41	30 :12	0,61		
03 :21	1,23	11 :12	1,02	30 :13	0,20		

FH : Fréquence Haplotypique

Annexe 4 : Matériel, Réactifs et solutions utilisées pour le test de lymphocytotoxicité.**Matériel**

- Une étuve à 37°C
- Un congélateur à -80°C
- Un congélateur à -30°C
- Un réfrigérateur
- Un microscope en phase inversée
- Une centrifugeuse réfrigérée
- Un agitateur
- Des micro-seringues de type "Hamilton" :
 - à 1 µl (aiguille simple).
 - à 5 µl (6 aiguilles).
- Des poires d'aspiration en caoutchouc pour pipettes
- Des pipettes graduées
- Des pipettes de type "Pasteur"
- Une micropipette (100 µl).
- Des cellules de Mallassez et lamelles.
- Des plaques micro-test à 60 alvéoles de type « TERASAKI » et lamelles.
- Des tubes à hémolyse.
- Des tubes herlen et des billes en verre.
- Des cupules en verre ou plastique.
- Des filtres en papier.
- Des gants à usage unique.

Réactifs et solutions

- PBS (phosphate Buffred Salin) sans Mg^{2+} , sans Ca^{2+} , solution prête à l'emploi.
- Ficoll-triosyl : solution prête à l'emploi.
- Bleu acétique, il se prépare avec :
 - Acide acétique pure (CH_3COOH) : 2 ml.
 - Bleu de méthylène : 3 gouttes.
 - Eau distillée : 100 ml.

Durée de conservation un mois.

- Eosine : solution à 5% : 5 g d'éosine plus 100 ml d'eau distillée.
- Formol :

- Soit 5,37 g de NaHPO₄ pour 100 ml d'eau distillée.
 - Au moment de l'utilisation amener le formol à pH = 7,2 par un ajustement avec le formol à 40%.
- PBS (phosphate Buffred Salin) sans Ca²⁺ et Mg²⁺.
 - Complément de lapin.

Annexe 5 : Matériel, Réactifs et solutions utilisées pour la réaction lymphocytaire mixte.**Matériel**

- Une étuve à 37°C.
- Un congélateur à -30°C.
- Un réfrigérateur.
- Un séparateur magnétique.
- Un microscope à fluorescence.
- Des micro-seringues de type "Hamilton" :
 - à 1 µl (aiguille simple).
 - à 5 µl (6 aiguilles).
- Des poires d'aspiration en caoutchouc pour pipettes.
- Des pipettes graduées.
- Des pipettes de type "Pasteur".
- Une micropipette (100 µl).
- Des plaques micro-test à 60 alvéoles de type « TERASAKI ».
- Des tubes à hémolyse.
- Des cupules en verre ou plastique.
- Des cupules en verre ou plastique.
- Chronomètre sonnerie.
- Des gants à usage unique.

Réactifs et solutions

- PBS citrate.
 - FluoroBeads-T et B (conserver à 2-5°C et utiliser avant la date d'expiration).
 - FluoroBeads-T développer 10X : préparation de la solution 1X : diluer la solution Stock 10X au 1/10 en PBS sans Ca²⁺ et Mg²⁺.
- La solution 1X est stable à 4°C jusqu'à la date de péremption.
- Milieu de Mac Coy : RPMI conserve à 4°C.
 - Réactif de coloration : Fluoro Quench : (ne pas exposer à de hautes températures, après ouverture refermer soigneusement et conserver à 2-8°C et utiliser avant la date d'expiration) afin d'éviter la contamination, ne pas remettre le Fluoro Quench non utilisé dans la bouteille stock.
 - Complément de lapin.

<p>Membres de Jury Présidente : DR. BOUTENNOUN Hanane Examinatrice : M^{me} ABBES Arbia Encadrant : M^{me} BENSEGHIER Salima</p>	<p>Présenté par : HELLAS Nouzha BELAIB Loubna</p>
<p align="center">Titre : Etude du polymorphisme HLA dans la population Algérien</p>	
<p>Résumé :</p> <p>Le système HLA est un système multigénique hautement polymorphe. Notre étude explore la distribution des antigènes HLA de classe I (locus A et B) dans la population de l'Est Algérien chez 244 individus. Les fréquences alléliques et haplotypiques ont été calculés et comparés à d'autres populations. Les allèles HLA-A et B les plus représentés sont : A2 (19,06 %), A9 (17,62 %), A3 (13,52 %), et A1 (12,70 %), B12 (16,19 %), B5 (12,91 %), B18 (7,58 %), et B7 (6,15 %) respectivement. Les haplotypes les plus fréquemment retrouvés dans notre population sont : A02 : B12 et A09 : B12 avec une fréquence de 4,10 %, A02 : A02 (6,15 %), B05 : B12 (3,69 %). Les résultats observés montrent que la population de l'Est Algérien présente des caractéristiques HLA spécifiques qui pourront être utilisées dans l'avenir pour l'étude des associations HLA et maladies, et dans la recherche d'un donneur d'organes compatible.</p>	
<p>Mots clés : Polymorphisme, système HLA, Est Algérien, typage HLA, allèle, haplotype.</p>	
<p>Abstract :</p> <p>The HLA system is a highly polymorphic multigene system. Our study explores the distribution of HLA class I antigens (locus A and B) in eastern Algeria population in 244 individuals. Allelic and haplotypic frequencies were calculated and compared to other populations. The most represented HLA-A and B alleles are: A2 (19.06%), A9 (17.62%), A3 (13.52%), and A1 (12.70%), B12 (16.19%). %, B5 (12.91%), B18 (7.58%), and B7 (6.15%) respectively. The haplotypes that are most frequently found in our population are: A02: B12 and A09: B12 with a frequency of 4.10%, A02: A02 (6.15%), B05: B12 (3.69%). The results observed show that the population of eastern Algeria has specific HLA characteristics that could be used in the future for the study of HLA associations and diseases, and in the search for a compatible organ donor.</p>	
<p>Key words: polymorphism, HLA system, East Algerian, HLA typing, allele, haplotype.</p>	
<p align="right">المخلص:</p> <p>نظام HLA هو نظام متعدد الجينات والأشكال. تستكشف دراستنا توزيع مستضدات ال HLA من الصنف الأول (موضع A و B) لدى 244 فرد من سكان الشرق الجزائري. تم حساب نسب الأليلات و نمطها الفردي ومقارنتها مع عينات سكانية لدول أخرى. بحيث أكثر الأليلات HLA-A و B الموجودة لدى عينة دراستنا هي: A2 (19.06 %)، A9 (17.62 %)، A3 (13.52 %) و A1 (12.70 %)، B12 (16.19 %)، B5 (12.91 %)، B18 (7.58 %) و B7 (6.15 %) بنسبة 4.10 %، A09: B12 و A02: B12 بنسبة 4.10 %، A02: A02 (6.15 %)، B05: B12 (3.69 %). تظهر النتائج الملاحظة أن سكان شرق الجزائر لديهم خصائص HLA مميزة يمكن استخدامها في المستقبل لدراسة ارتباطات ال HLA مع الأمراض و أيضا البحث عن متبرعين بالأعضاء متوافقين.</p>	
<p align="right">الكلمات المفتاحية: تعدد الأشكال ، نظام HLA ، شرق الجزائر ، تصنيف HLA ، أليل ، النمط الفردي.</p>	