

MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE PCR-SSP CIBLANT LES ALLÈLES HLA ASSOCIÉS À LA MALADIE CŒLIAQUE

Mariem Maaloul, Aida Charfi, Sirine Louati, Imen Daoud, Lilia Gaddour, Feiza Hakim, Arwa Kamoun, Nadia Mahfoudh
Laboratoire d'Immunologie et d'Histocompatibilité, CHU Hédi Chaker, Sfax, Tunisie

Contextualisation:

❖ Le système HLA: rôle crucial dans la pathogenèse de la Maladie cœliaque (MC).

❖ HLA-DQA1 et HLA-DQB1: les principaux facteurs génétiques impliqués.

❖ Allèles codant pour **HLA DQ2.5** (HLA-DQA1*05 et HLA-DQB1*02) et **DQ8** (HLA-DQA1*03 et HLA-DQB1*03:02): les majeurs marqueurs génétiques de susceptibilité pour la MC [1].

❖ Hétérodimères à moindre risque: **DQ2.2** (présence d'allèle **DQB1*02**) et **DQ7.5** (présence d'allèle **DQA1*05**) [1].

❖ Le typage HLA est souvent nécessaire pour appuyer le diagnostic de MC

Toutefois: problème budgétaire pour le typage de l'ensemble des allèles associés au risque de MC par les kits commerciaux

➔ Importance de développer une méthode d'appoint, efficace et moins coûteuse.

Objectifs: mettre au point et valider une PCR-SSP permettant la détection des allèles **HLA-DQA1*05** et **DQB1*03:02**, afin de mieux identifier le risque génétique de la MC.

Méthodes:

❖ La mise au point de l'amplification des allèles HLA-DQA1*05 et HLA-DQB1*03:02 a été réalisée en utilisant:

➔ 44 échantillons d'ADN sélectionnés au hasard, préalablement typés par PCR-SSO et NGS

➔ des amorces spécifiques pour chaque allèle

➔ QIAGEN® Fast Cycling PCR Kit

❖ Analyse des produits d'amplification par migration sur gel d'agarose

❖ Comparaison des résultats avec ceux préalablement obtenus

❖ Evaluation de la performance de notre technique a été réalisée en calculant: la sensibilité, la spécificité, la valeur prédictive positive (VPP) et la valeur prédictive négative (VPN) pour chaque allèle.

Résultats:

- ❖ La PCR-SSP a été optimisée avec succès en utilisant le protocole illustré dans le tableau I et le programme dans le tableau II:

Tableau I: Protocole de la PCR pour l'étude des allèles HLA-DQA1*05 et DQB1*03:02

Réactifs	Volume (µl)
Fast cycline Master Mix	5
Solution Q	2
Amorce Forward [pM]	5
Amorce Reverse [pM]	5
Colorant	1
ADN [100ng/µl]	1.5

Tableau II: Programme de la PCR pour l'étude des allèles HLA-DQA1*05 et DQB1*03:02

Nombre de cycles	Etapas	Température en °C	Temps en secondes
1	1	95	300
30	1	96	5
	2	58	5
	3	68	18
1	1	72	420

- ❖ Notre méthode a montré: une sensibilité, une spécificité, une VPP et une VPN de 100% chacune.

Discussion :

- ❖ Les résultats de la PCR-SSP ont montré une concordance de 100% avec ceux obtenus par PCR-SSO et NGS.
- ❖ La recommandation pour l'évaluation du génotype HLA associé à la MC est de tester la présence des allèles DQA1*05, DQB1*02 et DQB1*03:02 [1].
- ❖ Cette technique pourrait nous aider à stratifier le risque génétique en recherchant ces allèles, avec un coût inférieur à l'utilisation de kits commercialisés.

Conclusion et perspectives :

- ❖ Nous avons validé une technique sensible, spécifique et peu coûteuse qui permet le typage des allèles DQA1*05 et DQB1*03:02. La validation de cette technique pour l'allèle DQB1*02 serait aussi importante pour une meilleure évaluation du risque génétique de la MC dans notre laboratoire.

Références:

1. Espino L, Núñez C. The HLA complex and coeliac disease. Int Rev Cell Mol Biol. 2021;358:47-83. doi: 10.1016/bs.ircmb.2020.09.009.