

VALIDATION DE LA TECHNIQUE DE PCR-SSP POUR LE GENOTYPAGE HLA A ABIDJAN

KOUAMÉ DR¹, YAPO AVDP^{1, 2}, ANOZOUA BSE¹, INWOLEY A^{1, 2} DEMBÉLÉ B¹

RÉSUMÉ

Les techniques PCR sont utilisées en routine dans les laboratoires d'immunogénétique et d'histocompatibilité pour le typage HLA. En Côte d'Ivoire, très peu d'études ont été consacrées au HLA et aucune n'a mise en oeuvre la technique basée sur l'amplification des régions polymorphes du HLA à l'aide d'amorces spécifiques de séquence appelée PCR SSP. La présente étude avait pour objectif d'adapter et de valider cette méthode pour le génotypage HLA à Abidjan.

Nous avons réalisé une étude transversale comparative de novembre à décembre 2021 à Abidjan au sein de l'Unité de Biologie Moléculaire (UBM) du CeDReS. Nous avons utilisés des échantillons de sang de phénotype connu fournis par UK NEQAS. Pour chaque échantillon, 25 réactions de génotypage HLA A et 23 réactions pour l'HLA C ont été réalisées. Les

couples d'amorces et les conditions de PCR sont tirés des travaux de Bunce et collaborateurs. La révélation des produits de PCR a été réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%.

Les premières PCR telles que décrites par Brune et collaborateurs n'ont pas amplifié leurs cibles. Grâce à l'optimisation de la composition du milieu réactionnelle et des paramètres d'amplification, tous les génotypes HLA classe I présents ont été correctement identifiés. Les allèles représentés étaient le A1/A3 (n = 3), le A1/A43 (n = 2) pour le HLA A et C4/C4 (n = 2), C4/C7 (n = 1) et C7/C7 (n = 2) pour le HLA-C.

La technique de PCR SSP a été validée et peut être utilisée pour le typage HLA classe I.

MOTS-CLÉS : HLA, GÉNOTYPAGE, PCR SSP

ABSTRACT

PCR techniques are routinely used in immunogenetic and histocompatibility laboratories for HLA typing. However, In Côte d'Ivoire, very few studies have been devoted to HLA and none have implemented the technique based on amplification of polymorphic regions of HLA using specific sequence primers called PCR SSP. The objective of this study was to adapt and validate this method for HLA genotyping in Abidjan.

We carried out a comparative cross-sectional study from November to December 2021 in Abidjan within the Molecular Biology Unit (UBM) of the CeDReS. We used blood samples of known phenotype provided by UK NEQAS. For each sample, 25 HLA A genotyping reactions and 23 HLA C reactions were performed.

Primer pairs and PCR conditions are derived from the work of Bunce et al. The PCR products were revealed by electrophoresis on 1.5% agarose gel.

The early PCRs as described by Brune et al. did not amplify their respective targets. By optimizing the composition of the reaction medium and the amplification parameters, all Class I HLA genotypes present in the assessment samples were correctly identified. The alleles represented were A1/A3 (n = 3), A1/A43 (n = 2) for HLA A and C4/C4 (n = 2), C4/C7 (n = 1) and C7/C7 (n = 2) for HLA-C.

The PCR SSP technique has been validated and can be used for Class I HLA typing.

KEYWORDS: HLA, GENOTYPING, PCR SSP

1 : UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Abidjan (Côte d'Ivoire)

2 : Centre de Diagnostic et de Recherche sur le Sida et les autres maladies infectieuses (CeDReS)

INTRODUCTION

Le Complexe Majeur d’Histocompatibilité (CMH) ou Human Leukocyte Antigen (HLA) est un système très polymorphe qui joue un rôle important dans la différenciation du soi et du non-soi. En effet, les molécules HLA de classe I sont directement impliquées dans la capacité des lymphocytes T CD8⁺ à reconnaître et à éliminer les cellules infectées par un virus (Zinkernagel et al.), un phénomène appelé restriction au HLA de classe I. Ainsi, le seul paramètre qui a été à plusieurs reprises prédictif de l’évolution des maladies infectieuses est le HLA de classe I. Par exemple, les personnes qui contrôlent spontanément l’infection à VIH, ont tous l’allèle HLA-B*57:01 (Ben Radhia et al., Emu et al.). HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term non-progressors. Parallèlement, la présence de cet allèle est associée à une hypersensibilité à l’Abacavir (Kolou et al.).

Les méthodes sérologiques développées pour le typage HLA sont peu précises pour les antigènes du HLA des types A et B et peu fiables pour ceux du type C (Bozon et al.). De nombreuses techniques d’amplification génique ou PCR plus sensibles et plus spécifiques sont désormais utilisées en routine dans les laboratoires d’immunogénétique et d’histocompatibilité. La technique basée sur l’amplification des régions polymorphes du HLA à l’aide d’amorces spécifiques de séquence est appelée PCR SSP (PCR using sequence specific

primers). C’est une technique simple, robuste, nécessitant un minimum de matériel et relativement peu de temps de formation des opérateurs (Elsermans et al.). Cette technique a été utilisée dans différentes études en Afrique notamment au Sénégal pour l’identification des allèles HLA DR de susceptibilité à la polyarthrite rhumatoïde (Dieye et al.), en Mauritanie pour déterminer le polymorphisme HLA (Hamed et al.) et en Tunisie pour évaluer l’implication de HLA-B27 dans la spondylarthrite ankylosante (Ben Radhia et al.).

En Côte d’Ivoire, très peu d’études ont été consacrées au typage HLA de classe I et aucune n’a mise en oeuvre la technique PCR SSP (Ellis et al. Jennes et al.) . La première étude a examiné la fréquence des allèles HLA B par une technique de séquençage directe de l’ADN (Ellis et al.) et la seconde a identifié les allèles HLA B et C chez les travailleuses du sexe avec la technique PCR SSO (Jennes et al.). Pour la réalisation de ces études, les échantillons ont été expédiés hors du pays car les techniques utilisées étaient onéreuses et non accessibles pour les laboratoires locaux. La présente étude avait pour objectif d’adapter et de valider une méthode de PCR SSP pour le typage HLA de classe I (Bunce et al.) en utilisant les équipements déjà disponibles au CeDReS du CHU de Treichville afin de favoriser à terme l’accessibilité géographique du typage HLA aux populations d’Abidjan, en Côte d’Ivoire.

MATERIEL ET METHODES

Il s’agit d’une étude transversale comparative qui s’est déroulée de novembre à décembre 2021 à Abidjan (Côte d’Ivoire). Le typage HLA de classe I a été réalisé au sein de l’Unité de Biologie Moléculaire (UBM) du Centre de Diagnostic et de Recherches sur le SIDA et les autres maladies infectieuses (CeDReS). Nous avons utilisés cinq échantillons de sang total fournis par la structure internationale d’évaluation externe de la qualité UK NEQAS. Ces échantillons ont été aliquotés et conservés à -80 °C jusqu’à la réalisation des analyses biologiques. Les amorces de PCR utilisées sont tirées des travaux de Bunce et collabo-

rateurs (Bunce et al.). Elles couvrent l’ensemble des antigènes connus à la date de la révision de la nomenclature HLA de 2010 (Marsh_JulAug-Sep_2020_NomUpdate_HI.pdf).

L’extraction de l’ADN a été réalisée avec le kit QIAamp DNA Mini de QIAGEN (Mannheim, Allemagne) selon la procédure décrite par le fabricant. Après l’extraction, la quantité d’ADN génomique et la pureté de l’extrait obtenu ont été vérifiées par la mesure de la densité optique au spectrophotomètre Biophotometer d’Eppendorf (Hambourg, Allemagne). Le volume final de chaque réaction

de PCR était de 20 μ l. Ce volume était composé de 10 μ l de Dream Taq master mix d'Invitrogen (Cortabœuf, France), de 1 μ l de chaque amorce sens ou antisens HLA spécifique et du contrôle interne (DRB1 ou APC) soient 4 μ l au total d'amorces, de 4 μ l d'eau qualité biologie moléculaire et de 2 μ l d'extrait d'ADN génomique. Après les premiers essais, la composition du milieu réactionnel a été ajustée en remplaçant l'eau qualité biologie moléculaire par l'extrait d'ADN soit un volume total d'extrait de 6 μ l au lieu de 2 μ l.

Pour chaque échantillon analysé, 25 réactions ont été faites pour la détermination du génotype HLA A et 23 réactions pour le génotype HLA C en utilisant les couples d'amorces spécifiques soit un total de 48 PCR/échantillon. L'amplification a été effectuée à l'aide du thermocycleur à couvercle chauffé GeneAmp 2700 d'Applied Biosystems (Cortabœuf, France). Les paramètres d'amplification après optimisation étaient les suivants : activation de la Taq polymérase à 98°C pendant 3 minutes, suivie d'une étape de préamplification consistant en 20 cycles de 25 secondes à 98°C (dénaturation des matrices doubles brins d'ADN) + 50 secondes à 65°C (hybridation des amorces aux matrices simples brins) + 45 secondes à 72°C (élongation). Après la préamplification, l'étape d'amplification a consisté en 21 cycles de 30 secondes à 98°C, 1 minute à 56°C et 10 secondes

à 72°C. Une phase d'extension finale à 72°C pendant 7 minutes a conclu les PCR. La présence ou l'absence de produits PCR a été visualisée à l'aide de l'UV Transilluminator MUV21-312 de Biocom (Nantes, France) après électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% préalablement coloré de bromure d'éthidium (3 μ l pour 25ml de tampon de migration TAE 1X). Des photos de chaque gel ont été réalisées grâce à un appareil photonumérique TECNO Camon 16 (Shenzhen, Chine). Chaque gel avait un puits contenant le marqueur de poids moléculaire GeneRuler 100bp d'Invitrogen (Cortabœuf, France). L'interprétation des résultats s'est faite en déterminant le poids moléculaire de la bande de PCR apparue par comparaison aux bandes fournies par le marqueur de poids moléculaire. Cette bande devrait correspondre à la taille indiquée pour le couple d'amorces spécifiques utilisé. L'absence de la bande HLA spécifique et de celle du contrôle interne signifiait qu'un problème était apparu durant la PCR sur l'échantillon considéré. Le résultat était alors invalide et la PCR devait être reprise pour la réaction et l'échantillon considérés. A la suite des PCR, un génotype HLA de classe I pour les antigènes HLA-A et HLA-C a été attribué à chaque échantillon du panel et comparé aux génotypes obtenus par UK NEQAS.

RESULTATS

A la première tentative, il n'y avait ni bande de contrôle interne ni bandes d'antigènes HLA testés sur le gel d'électrophorèse (Figure 1).



Figure 1 : Gel d'électrophorèse avant optimisation des conditions opératoires.

Puits 1 = marqueur de poids moléculaires, puits 2 = HLA-A - PCR 1 (bande de 629 pb), puits 3 = HLA-A - PCR 2 (489 pb), puits 4 = HLA-A -

PCR 3 (628 pb), puits 5 = HLA-A - PCR 8 (170 pb), puits 6 = HLA-A - PCR 9 (440 pb), puits 7 = HLA-A - PCR 10 (400 pb), puits 8 = HLA-A - PCR 18 (198 pb), puits 9 = HLA-A - PCR 19 (259 pb), puits 10 = HLA-A - PCR 21 (628 pb), puits 11 = HLA-A - PCR 22 (447 pb), puits 12 = HLA-C - PCR 4 (331 pb), puits 13 = HLA-C - PCR 05 (564 pb), puits 14 = HLA-C - PCR 07 (1062 pb), puits 15 = HLA-C - PCR 13 (523 pb), puits 16 = HLA-B - PCR 5 (543 pb), contrôle positif interne = gène APC (bande de 256 pb) présent dans tous les puits d'échantillons.

Dans le second gel, il y avait une bande de PCR/puits d'une taille d'environ 256 pb pour le contrôle interne dans 9 puits/15 ainsi qu'une bande HLA spécifique en position 12 (figure 2).

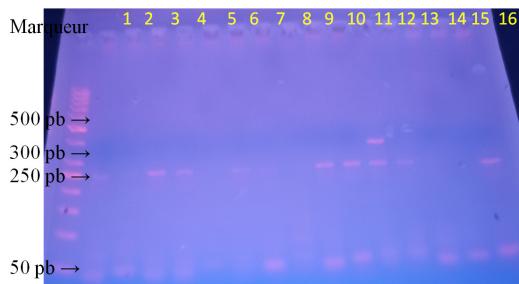


Figure 2 : Gel d'électrophorèse après re-extraction de l'échantillon 1

Cette bande de produits de PCR HLA spécifique correspondait à l'antigène HLA-C4.

Un ajustement du volume réactionnel et des paramètres d'amplification nous ont permis d'obtenir une bande de contrôle interne dans au moins 80% des puits d'échantillon. Les résultats obtenus pour les échantillons 1, 2 et 3 sont montrés à titre d'exemples dans les figures 3 à 5.

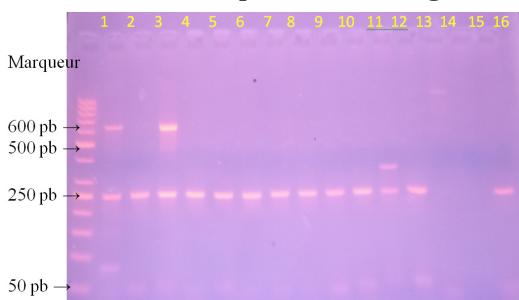


Figure 3 : Conditions optimisées pour l'échantillon 1

Pour l'échantillon 1, la PCR du contrôle interne APC était positive dans tous les puits sauf dans les puits 14 et 15, soit 13 PCR positives sur 15 (86,7%). Les PCR HLA-spécifiques étaient positives dans les puits 2, 4, 12 et 14 indiquant que l'échantillon 1 avait un génotype HLA A1/A3 et HLA C4/C7 (hétérozygotie pour les antigènes HLA-A et HLA-C).

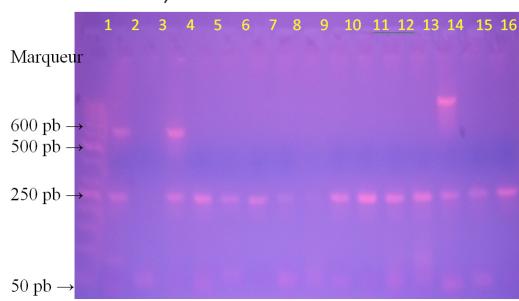


Figure 4 : Conditions optimisées pour l'échantillon 2

Pour l'échantillon 2, la PCR du contrôle interne APC était positive dans tous les puits sauf dans le puits 3, soit 14 PCR positives/15 (93,3%). Les PCR HLA spécifiques étaient positives dans les puits 2, 4 et 14 indiquant que l'échantillon 2 avait un génotype HLA A1/A3 (hétérozygote HLA-A) et HLA C7/C7 (homozygote HLA-C).

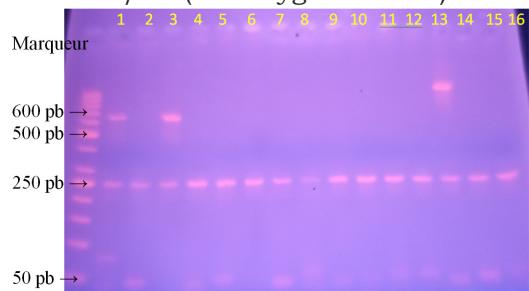


Figure 5 : Conditions optimisées pour l'échantillon 3

Pour l'échantillon 3, toutes les réactions du contrôle interne APC étaient positives (100%). En outre, trois PCR HLA spécifiques avaient donné des produits d'amplification de taille correcte dans les puits 2, 4 et 14 indiquant que l'échantillon concerné avait un génotype HLA A1/A3 (hétérozygote HLA-A) et HLA C7/C7 (homozygote HLA-C).

Le tableau I résume les différents génotypes HLA observés.

Tableau I : Génotypes HLA A et C des différents échantillons

Génotype HLA classe I		
Echantillons	HLA A	HLA C
HLA 06-2021	A03/A74	C04/C07
HLA 07-2021	A01/A03	C07/C07
HLA 08-2021	A03/A32	C03/C05
HLA 09-2021	A25/A68	C03/C05
HLA 10-2021	A02/A31	C04/C05

DISCUSSION

La PCR-SSP classique est une technique simple, robuste, nécessitant un minimum de matériel et relativement peu de temps de formation des opérateurs. Il s'agit d'une technique "de base", très manuelle, des laboratoires HLA qui permet d'identifier un allèle spécifique ou un groupe d'allèle (Elsermans et al.). La présente étude a été réalisée pour adapter et valider une technique PCR SSP pour le typage HLA de classe I en utilisant les ressources à notre disposition. Cette technique pourrait permettre d'améliorer la prise en charge des patients en Côte d'Ivoire et trouver également une application en recherche. La stratégie d'amplification décrite par Bunce et collaborateurs, utilisée dans les premiers gels n'a pas permis d'amplifier l'ADN de manière optimale. Cela s'est traduit par l'absence de bande du contrôle interne dans de nombreux puits. Plusieurs raisons peuvent expliquer l'absence de bandes de contrôle interne selon les données de la littérature. Ce sont la présence d'ADN génomique impur ou en quantité insuffisante, une mauvaise homogénéisation des amorces, des extraits d'ADN génomique et des milieux réactionnels, un pipetage incorrect, de mauvaise conditions de PCR dans les différents puits (défaut d'homogénéité du bloc chauffant) et une stratégie d'amplification non optimale (Bunce et al.). Fort de ce constat, la technique a été optimisée en ajustant ces différents paramètres. Cela a permis d'obtenir les bandes du contrôle interne dans les puits d'échantillons et donc de valider la technique puis de voir des bandes HLA spécifiques au poids moléculaire escompté. Des

échecs de réaction d'amplification ont été observés dans certains puits. Ces échecs sont liés à la formation de dimères ou à la production de faibles amplicons ; dans ces cas la réaction individuelle doit être reprise. L'absence d'un allèle attendu (faux négatif) alors que la bande de contrôle interne est positive n'a pas été observé dans notre étude. Ces cas sont rares et sont liés à des paramètres d'amplification incorrectes, une mauvaise homogénéité des températures dans l'ensemble du bloc chauffant, un mauvais fonctionnement du thermocycleur ou mauvaise étanchéité des tubes de PCR, une mauvaise concentration en magnésium et à la présence d'un nouveau allèle (Bunce et al.). L'utilisation d'huile de PCR permet de prévenir l'évaporation des mélanges réactionnels au cours des cycles d'amplification. De même, l'utilisation d'un coussinet en mousse plastique placé entre le couvercle du bloc chauffant et les tubes de PCR permet de maximiser les contacts entre les tubes de PCR et le bloc chauffant et de renforcer l'étanchéité des tubes de PCR. La technique PCR SSP est laborieuse car pour un même échantillon, de nombreuses réactions PCR sont nécessaires (24 réactions pour HLA A, 48 réactions pour HLA B et 26 réactions pour HLA C). L'utilisation de pipette multicanaux adaptée peut alléger le travail pour les grandes séries. De plus cette technique est bien adaptée à notre contexte de pays à ressources limitées comparativement aux autres techniques de biologie moléculaire car elle ne nécessite pas d'équipements supplémentaires pour sa mise en œuvre dans notre laboratoire.

CONCLUSION

Cette étude nous a permis de valider la technique PCR SSP pour le génotypage HLA classe I dans notre laboratoire. Cela ouvre de nouvelles perspectives en ce qui concerne la thérapeutique de greffe qui demeure encore aujourd'hui un défi à relever pour notre système de santé. Cependant, avant son utilisation en pratique, des études supplémentaires doivent être réalisées pour consolider les acquis.

Remerciements

Nous adressons nos remerciements au Professeur Hervé MENAN, le Docteur Fatoumata KONE ainsi que tout le personnel technique de l'unité de Biologie Moléculaire (UBM) du Centre de Diagnostic et de Recherche sur le Sida et les autres maladies infectieuses (CeDReS) pour leur soutien pendant les travaux expérimentaux.

REFERENCES

1. Ben Radhia K, Ayed-Jendoubi S, Ben Romdhane IST, Makhlof M, Gorgi Y, Ayed K. Distribution des sous-types HLA-B27 en Tunisie et leur association avec la spondylarthrite ankylosante. *Revue du Rhumatisme*. 1 mars 2008;75(3):250-3.
2. Bozón MV, Delgado JC, Selvakumar A, Clavijo OP, Salazar M, Ohashi M. Error rate for HLA-B antigen assignment by serology: implications for proficiency testing and utilization of DNA-based typing methods. *Tissue Antigens*. oct 1997;50(4):387-94.
3. Bunce M, O'Neill CM, Barnardo MC, Krausa P, Browning MJ, Morris PJ. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens*. nov 1995;46(5):355-67.
4. Bunce M, Passey B. HLA typing by sequence-specific primers. *Methods Mol Biol*. 2013;1034:147-59.
5. Dieye A, Diallo S, Diatta M, Alassane T, Ndiaye R, Bao O. [Identification of HLA-DR alleles for susceptibility to rheumatoid polyarthritis in Senegal]. Dakar médical. 1 févr 1997;42:111-3.
6. Elsermans V, Guidicelli LG, Walencik A. Les méthodes de typage HLA. 2018;6.
7. Emu B, Sinclair E, Hatano H, Ferre A, Shacklett B, Martin JN. HLA Class I-Restricted T-Cell Responses May Contribute to the Control of Human Immunodeficiency Virus Infection, but Such Responses Are Not Always Necessary for Long-Term Virus Control. *Journal of Virology*. juin 2008;82(11):5398-407.
8. Ellis JM, Hoyer RJ, Costello CN, Mshana RN, Quakyi IA, Mshana MN. HLA-B allele frequencies in Côte d'Ivoire defined by direct DNA sequencing: identification of HLA-B*1405, B*4410, and B*5302. *Tissue Antigens*. avr 2001;57(4):339-43.
9. Hamed CT, Meiloud G, Veten F, Hadrami M, Ghaber SM, Boussaty EC. HLA class I (-A, -B, -C) and class II (-DR, -DQ) polymorphism in the Mauritanian population. *BMC Med Genet*. 3 janv 2018;19:2.
10. HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors [Internet]. [cité 9 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.050567397>
11. Jennes W, Verheyden S, Demanet C, Adjé-Touré CA, Vuylsteke B, Nkengasong JN. Cutting Edge: Resistance to HIV-1 Infection among African Female Sex Workers Is Associated with Inhibitory KIR in the Absence of Their HLA Ligands. *The Journal of Immunology*. 15 nov 2006;177(10):6588-92.
12. Kolou M, Poda A, Diallo Z, Konou E, Dokpomiwa T, Zounguana J. Prevalence of human leukocyte antigen HLA-B*57:01 in individuals with HIV in West and Central Africa. *BMC Immunol*. 22 juill 2021;22:48.
13. Marsh_JulAugSep_2020_NomUpdate_HI.pdf [Internet]. [cité 9 mai 2022]. Disponible sur: https://discovery.ucl.ac.uk/id/eprint/10138407/1/Marsh_JulAugSep_2020_NomUpdate_HI.pdf
14. Pereyra F, Addo MM, Kaufmann DE, Liu Y, Miura T, Rathod A. Genetic and Immunologic Heterogeneity among Persons Who Control HIV Infection in the Absence of Therapy. *J INFECT DIS*. 15 févr 2008;197(4):563-71.
15. Zinkernagel RM, Doherty PC. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*. 19 avr 1974;248(5450):701-2.