

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEM
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE DE LA TERRE ET DE
L'UNIVERS

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire de MASTER

Biologie moléculaire et génétique

Présenté par

BELAID Nadia

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie

Option : Biologie moléculaire et génétique

Elaboration d'amorces pour le gène de la Glutathion peroxydas 3

GPx3

Soutenue le 08/07/2017

Devant le jury :

Dr. DALI-SAHI Majda.

Maître de conférences A

Président

Dr. BOULENOUAR Houssam.

Maître de conférences B

Encadreur

Dr. MADJATI Noria.

Maître de conférences B

Examinatrice

Année Universitaire : 2016-2017

Dédicace

Grâce à mon Dieu le tout Puissant. Que je remercie de m'avoir aidé à terminer ce travail. Je dédie mon travail à mes très chers parents, à ma mère qui m'a encouragé à aller de l'avant et mon père je n'oublie jamais leur amour leur sacrifice leur patience envers moi. Jamais je ne peux les remercier assez de m'avoir donné le meilleur d'eux. Même que Dieu les protège.

Et à mon cher mari.

Mes chers frères : djawad et zakî .

Mes sœurs : Hanan et lamis

Toute ma famille paternelle, et maternelle et la famille BOUTERFAS.

Mes chères amies : Amel, Badra ,téma , Latifa ,khadija ,Ikram Tous mes enseignants depuis mes années d'études.

Tous les membres de ma promotion de biologie moléculaire et génétique

Remerciement :

Avant tout, je remercie Allah qui m'a guidé et donné la force, le courage et la volonté pour réaliser ce modeste travail.

Je commence par exprimer ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements au « Mme DALI-SAHI Majda » qui m'a honoré en acceptant de diriger ce travail.

Je ne peux que sincèrement vous exprimer mon respect et ma gratitude.

Mes vifs remerciements à mon encadreur BOULENOUAR Houssam Pour nous avoir aidé à corriger notre travail et avoir accepté de faire partie de notre jury et Mme MADJATI Nouria, Membre de jury, pour avoir participé à ce travail, et d'avoir accepté de prendre part au jury, je vous remercie vivement.

Ce travail a pour objectif d'élaboration d'une amorce pour le gène glutathion peroxydase3 GPX3

Le mémoire est structuré en divers parties : introduction, Bibliographie, matériels et méthodes, résultats et interprétations, conclusions et références bibliographiques.

Table des matières :

Liste des abréviations.....	III
Liste des figures.....	IV
Liste des tableaux.....	V
Introduction.....	01

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

I. Définition de la glutathion peroxydase	3
II. Les types de glutathion peroxydase	3
II.1. Les GPxs séléno-dépendantes	3
II.2. Les GPxs séléno-indépendantes.....	4
III. La GPX3 : La glutathion peroxydase plasmatique GPxP,GPx-3.....	4
IV. La fonction de GPx3 :	6
V. Les maladies associées au GPx3	7
V.1. Cancer de prostate :	7
V.2. Le stress oxydatif.....	8
VI. ELABORATION DES AMORCES	9
VI.1. Les amorces :	9
VI.1.1. Définitions des amorces.....	9
VII. Définition de PCR :	9
VII.1. Le but de la PCR :.....	10
VII.2.Principe de la PCR	10
VII.2.1.La dénaturation :.....	10
VII.2.2.L'hybridation :.....	10
VII.2.3L'élongation :	11

Chapitre II: Matériel et Méthodes

I. Conception des amorces pour la PCR.....	13
--	----

II. Sélection des amorces.....	13
II.1. La longueur de l'amorce	13
II.2. Température de fusion (Tf).....	13
II.3. Spécificité	14
II.4. Séquences d'amorce complémentaire.....	14
II.5. Teneur en G/C et suites polypyrimidine (T, C) ou polypurine (A, G).....	14
II.6. Séquence à l'extrémité 3'	14
III. La séquence du Gène GPx3	15
IV. Le polymorphisme rs8177404 de gène GPx3	16
V. L'outil primer3	16
VI. Les étapes de primer3 :	17

Chapitre III: Résultats et interprétation

I. Résultats de la conception des amorces :.....	20
I.1. obtention de la séquence d'intérêt :.....	20
I.2. conception des amorces.....	20
II. Confirmations des résultats:.....	22

Liste des abréviations

GPx	Glutathion peroxydase
GPx3	Glutathion peroxydase3
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
PCR	Polymerase chain reaction
ROS	Reactive oxygen species
GSH	reduced glutathione/glutathion réduit
GSSG	oxidized glutathione/glutathion oxydé
GST	glutathione s transferase/glutathione s transférase
HO₂	radical perhydroxyle
HOO·	radical hydroperoxyle
LOOH	hydroperoxyde lipidique
NO·	monoxyde d'azote
T_f	température de fusion

Liste des figures

Figure 1: Mode d'action de la GPx.LOOH :hydroperoxyde ;LOH :composè lipidique rèduit.	3
Figure 2: Déséquilibre du statut pro/anti oxydant en faveur dun stress	9
Figure 3: Plateforme de dbSNP	15
Figure 4: La séquence de polymorphisme rs 8177404.....	16
Figure 5: Interface de l'outil Primer3	18
Figure 6: Résultats obtenus après utilisation du logiciel Primer3	21
Figure 7: Résultats de 4 séquences qui sont restent	22
Figure 8: Utilisation du site (http://genome.ucsc.edu/)	23

Liste du tableau :

Tableau 1: Les isoenzymes de glutathion peroxydase. 4

Introduction

1. Introduction

La glutathion peroxydases (GPx) est une famille d'enzymes antioxydants, leur principale fonction est de neutraliser le peroxyde d'hydrogène ainsi que les hydroperoxydes organiques aux niveaux intracellulaire et extracellulaire (**Brigelius, 1994**).

Les GPx sont les seules enzymes à pouvoir neutraliser de très faibles concentrations de H₂O₂, elle est composée de huit isoenzymes l'un de ces huit isoenzymes est la glutathion peroxydase plasmatique (GPx-3).

La glutathion peroxydase plasmatique (GPx-3) est une enzyme antioxydante majeure dans le plasma, c'est un membre de la famille *GPx* contenant de la sélénocystéine, son gène est situé dans la région q32 du chromosome 5 (**Brigelius et al., 2013**). *GPx3* protège les cellules contre les dommages oxydatifs engendrés par les espèces réactives d'oxygène (ROS). (**Brigelius et al., 1999 et Müller, 2003**)

Les changements dans la concentration de GPx3 ainsi que de nombreux polymorphismes génétiques à un seul nucléotide (SNP) au niveau du gène *GPx3*, ont été associés à des maladies vasculaires, mais la relation de *GPx3* avec le syndrome métabolique (MetS) reste très peu explorée. La GPx-3 protège également contre les modifications post-traductionnelles du fibrinogène par les oxydants dérivés du ROS et du NO qui augmentent sa thrombogénicité

Dans ce travail nous nous sommes focalisés sur l'un des polymorphismes du gène *GPx3*, pour lequel on a élaboré des amorces en utilisant l'outil de Primer3.

L'objectif de notre étude d'association génétique représente une étape majeure dans la compréhension des mécanismes moléculaires, à l'origine des pathologies humaines.

Ces études consistent à mettre en évidence d'éventuelles associations statistiquement significatives entre des variants génétiques et la survenue de certaines pathologies. Les plus étudiés de ces variants génétiques dans ce genre d'études étant les SNP (single nucleotide polymorphism).

L'analyse génétique de ce genre de variants peut se faire par diverses techniques. Notre travail constitue l'étape préliminaire ou initiale dans toute étude d'association génétique. Pour notre part, nous sommes intéressés à étudier le SNP rs8177404 du gène *GPx3*. Cette étape est la conception d'amorces, qui encadrent la variation génétique.

Dans ce travail nous allons donc concevoir, avec spécificité un couple d'amorce encadrant le rs8177404 du gène *GPx3* afin de pouvoir réaliser par la suite, des études d'association génétique impliquant le polymorphisme rs8177404.

A la fin de ce travail nous aurons réussi à élaborer et à définir, les séquences des oligonucléotides qui serviront d'amorces à l'amplification par réaction de polymérisation en chaîne PCR, du fragment encadrant le rs8177404 du gène *GPx3*.

Synthèse bibliographique

I. Définition de la glutathion peroxydase

La glutathion peroxydases (GPx) est un ensemble d'enzymes tétramériques localisé dans le cytosol ainsi que dans la mitochondrie (LACOLLEY, 2007), la GPx est la première sélénoprotéine identifiée (Rotruck *et al.*, 1973) . Leur principale fonction est de neutraliser le peroxyde d'hydrogène ainsi que les hydro peroxydes organiques aux niveaux intracellulaire et extracellulaire (BERLING *et al.*, 1999)

Elle joue un rôle clé dans la protection de l'organisme contre les dommages oxydatifs (Bhabak *et al.*, 2010). Les GPx sont les seules enzymes à pouvoir neutraliser de très faibles concentrations de H₂O₂, selon la réaction ci-dessous, en utilisant le glutathion pour former du H₂O, et transformer le glutathion en sa forme oxydée.

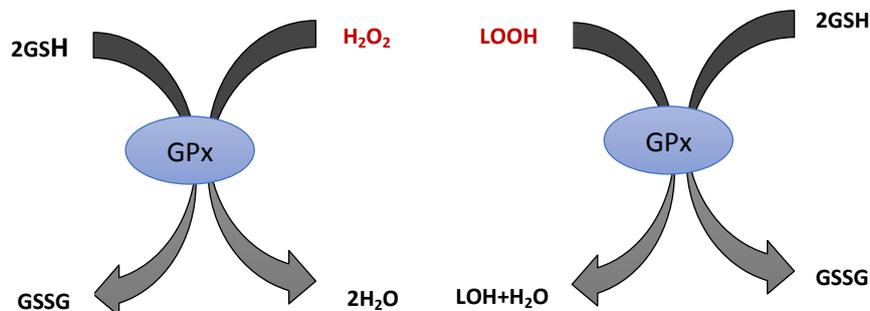


Figure 1: Mode d'action de la GPx. LOOH :hydroperoxyde ;LOH :composé lipidique réduit.

II. Les types de glutathion peroxydase

Il existe 8 isoenzymes chez l'homme (tableau 1) caractérisées par des fonctions similaires mais avec des modes d'action et des sites d'action différents (MULLER *et al.*, 2007). Elles peuvent être classées en deux grands groupes :

II.1. Les GPxs séléo-dépendantes

Les GPxs séléo-dépendantes sont caractérisées par la présence d'un atome de sélénium au niveau de leur site actif. Ce résidu sélénium est lié à une cystéine et forme le 21^{ème} acide aminé. (Mullenbach *et al.*, 1987) il est responsable d'éliminer la présence de toute forme de peroxydes qui endommagent les lipides qui peuvent émerger. On a 5GPx séléo-dépendantes sont : GPx1, GPx2, GPx3, GPx4, GPx5 (Alexander, 2015 ;Kryukovet al., 2003)

II.2. Les GPxs séléo-indépendantes

Caractérisé par l'absence de sélénium au niveau de leur site actif. les ARNm de ces enzymes ne possèdent pas de codon UGA codant pour une séléo-cystéine mais un codon UGC codant une simple cystéine on a 3 GPxs séléo –indépendantes sont :GPx5, GPx7, GPx8 (Tang *et al.*, 1995).

Tableau 1: Les isoenzymes de glutathion peroxydase. (Muller *et al.*, 2007)

Gene	Locus	Enzyme
GPX1	Chr .3p21.3	Glutathion peroxydase1
GPX2	Chr. 14q24.1	Glutathion peroxydase2
GPX3	Chr. 5q32	Glutathion peroxydase3
GPX4	Chr. 19p13.3	Glutathion peroxydase4
GPX5	Chr. 6p21.32	Glutathion peroxydase5
GPX6	Chr. 6p23	Glutathion peroxydase6
GPX7	Chr. 1p32	Glutathion peroxydase7
GPX8	Chr. 5q11.2	Glutathion peroxydase8

III. La GPX3 : La glutathion peroxydase plasmatique GPxP,GPx-3

La GPx3 est connue sous le nom de glutathion peroxydase plasmatique ou de glutathion peroxydase extracellulaire, est la seule isoforme extracellulaire glycosylée connue, c'est une protéine homotétramère (**Brigelius et al., 1994**) possédant quatre sous-unités de 23 à 25kDa. La GPx-3 est codée par un gène qui contient cinq exons qui s'étendent sur 10 kb dans la région q32 du Chromosome 5 (**Brigelius et al., R 2013**) c'est une protéine pouvant être sécrétée et on la retrouve dans le plasma ,le lait maternel ,le liquide amniotique, les poumons (**whitine et al.,2002**).La GPx3 protège les cellules contre les dommages oxydatifs engendrés par les espèces réactives d'oxygène (ROS). (**Brigelius ,1999 et Müller ,2003**).

ay. Elle permet aussi le maintien de la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO) dans les vaisseaux (**Wolin, 2011 ; Papp et al., 2007**). La GPx3 est la deuxième plus abondante parmi les sélénoprotéines plasmatiques et la seule de sa famille à exercer une fonction antioxydante extracellulaire et permet aussi le maintien de la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO) dans les vaisseaux (**Papp et al ., 2007**).

L'ARNm de *Gpx3* est exprimé de manière spécifique aux tissus par le rein, le cœur, le poumon, le foie, le cerveau, le tissu adipeux, le sein et le tractus gastro-intestinal, mais la majorité des Gpx3 plasmatiques sont dérivés du rein (**Maeda et al ;1997 et Tham et al., 1998**). Gpx3 est transporté par circulation où il se lie aux membranes basales des cellules épithéliales telles que celles du tractus gastro-intestinal . L'hyperméthylation du promoteur Gpx3 et la régulation négative sont généralement observées dans le cancer humain (**Chen et al ;2011- Murawaki ,2008**). Dans le cancer de la prostate, les deletions hemizygous et homozygotes ainsi que la méthylation du premier exon de *GPx3* se produisent fréquemment (**Yu YP et al .,2007**). L'hyperméthylation du promoteur assure une diminution de l'expression de *Gpx3* dans les cancers gastriques, cervicales, thyroïdiennes, de la tête et du cou, ainsi que dans le cancer du poumon et dans le mélanome (**Chen et al;2011, Zhang .2010**) suggérant que Gpx3 sert de suppresseur de tumeur dans ces cancers.

Ainsi, la perte de GPx3 contribue probablement à l'activation ou au recrutement différentiel des macrophages qui favorise davantage la croissance et la survie de la tumeur. Il s'agit d'une découverte intéressante car la carence en sélénoprotéine entraîne une diminution de la migration des macrophages (**Carlson et al .,2009**) et le sélénium augmente la capacité d'un

hôte à générer des lymphocytes et des macrophages cytotoxiques pour détruire les cellules tumorales (**Kiremidjian et al ., 1992**).

La méthylation *GPx3* est en corrélation avec la chimiothérapie du cancer de la tête et du cou (HNC) et peut servir d'indicateur de pronostic potentiel pour les patients HNC traités par chimiothérapie à base de cisplatine. Nos résultats confirment l'hypothèse selon laquelle les défauts du système antioxydant peuvent contribuer à la tumorigénèse d'un large éventail de malignités humaines. La méthylation *GPx3* peut avoir des implications dans la réponse de chimiothérapie et les résultats cliniques des patients HNC. La glutathion peroxydase3 (GPx3) a été souvent réprimée dans de nombreux cancers en raison de l'hyperméthylation du promoteur et est connu comme un éventuel gène suppresseur de tumeur.

L'expression de *GPx3* réduite a été trouvée dans le cancer de la prostate, le cancer de l'endomètre et le cancer de la tête et du cou. L'hyperméthylation du promoteur *GPx3* réduit l'expression de ce gène, qui est associé au mécanisme de la résistance aux médicaments (**Brigelius et Maiorino.,2013 et Chen et al., 2011**). L'interaction entre GPx3 et la protéine PIG3 (une protéine induite par TP53 du gène 3) active l'apoptose dans les cellules cancéreuses de la prostate (**Wang et al ;,2012**). Beaucoup d'agents chimiothérapeutiques génèrent des radicaux libres et provoquent ainsi une apoptose dans les cellules tumorales (**Brigelius et Maiorino, 2013 et Chen et al ., 2011**).

IV. La fonction de GPX3 :

GPX-3 est efficace dans la protection contre la toxicité de l'acétaminophène, bien que sa surexpression peut également causer des effets néfastes (**Mirochnitchenko et al.,1995**),la plupart des informations concernant la fonction biologique de la protéine provient d'études de son expression tissulaire et des effets de la maladie sur la synthèse de la protéine.

Comme la plupart des GPx3 se retrouvent dans le plasma et les fluides extracellulaires , elle est glycosylée pour améliorer la stabilité et agir comme un antioxydant, peut-être la cellule de protection membranes. Contrairement à GPx1, GPx3 a une activité contre les hydroperoxydes de phospholipides, ce qui lui donne un rôle plus direct dans la protection des membranes (**Yamamoto et al ., 1993**).

Bien que GPx3 soit synthétisé dans une gamme de tissus, la principale source de plasma est dans le rein.

Chez l'homme, on retrouve au niveau du rein les taux les plus élevés d'ARNm de GPx suivi par d'autres organes (**Ursini *et al.*,1985**).

L'importance du rein comme source de GPx extracellulaire a été souligné par la localisation de son ARNm dans les cellules épithéliales des tubules proximaux chez l'homme, Rats et souris (**Bjornstedt *et al.*, 1994**). Les humains et les rats anéphriques ont une très faible activité de GPx3 dans le plasma. Les patients souffrant de maladies rénales ont également une très faible activité de GPx plasmatique, y compris ceux qui subissent une dialyse rénale. Ces diminutions de GPx3 dans le plasma ne sont pas associées à la déficience en sélénium chez les patients (référence). En raison de la synthèse et la sécrétion de GPx3 dans le rein et dans la glande thyroïde GPx3 peut contrôler les niveaux de peroxyde d'hydrogène nécessaire à l'hormone thyroïdienne (**Howie *et al.*, 1995**).

V. Les maladies associées au GPx3

V.1. Cancer de prostate :

GPx3 est facilement détectable dans le plasma, ce qui suggère qu'il constitue la première ligne de défense contre les espèces réactives d'oxygène (ROS), même avant leur entrée dans les cellules il existe de nombreuses preuves suggérant que les enzymes impliquées dans le métabolisme ROS sont essentielles pour protéger les cellules et assurer la progéniture d'une cellule génétiquement intacte, GPx3 est l'un des gènes les plus régulés. La régulation négative de GPx3 est largement retrouvée dans le cancer de la prostate. Cependant, l'arrêt complet de l'expression GPx3 est en corrélation avec un pronostic plus faible. Cela peut refléter la possibilité que l'absence de GPx3 rende les cellules extrêmement vulnérables aux dommages ROS et augmente l'instabilité du génome. Il serait également intéressant de noter qu'une diminution de l'expression de GPx3 peut être détectée dans des tissus de prostate morphologiquement bénins adjacents au cancer, la diminution de la régulation de GPx3 a été trouvée étroitement associée à la progression du cancer (**Yu *et al.*,2006**).

Les sélénoprotéines comme la GPx3 peuvent jouer un rôle protecteur dans le développement du cancer de la prostate.

V.2. Le stress oxydatif

Le stress oxydant est produit par une accumulation toxique de radicaux libres oxygénés produits par la respiration (O_2^- , $OH\cdot$, $NO\cdot$) qui inactive la plupart des biomolécules de la cellule. Les cellules régulent la concentration en radicaux oxygénés (ROS) grâce à l'activité de systèmes enzymatiques antioxydants et à la présence d'antioxydants (vitamine E, glutathion). L'accident vasculaire cérébral est la deuxième cause de décès dans le monde¹ et la principale cause de l'invalidité de longue durée dans les pays développés. La déficience en glutathion peroxydase plasmatique (GPx-3) augmente le stress oxydant extracellulaire, diminue l'oxyde nitrique bio disponible et favorise l'activation des plaquettes.

Le stress oxydatif joue un rôle clé dans la survie cellulaire et la prolifération de plusieurs types de cancer (**Fiaschi *et al.*, 2012**) Le stress oxydatif pourrait causer une mutation génétique, (**Gasche ,2001**) ,réguler les voies de signalisation qui contrôlent la survie cellulaire et l'invasivité et de fournir favorables micro-environnement pour le développement du cancer (**Pavlidis *et al.*, 2010**).

Le stress oxydatif se définit par la présence de dérivés actifs de l'oxygène ou de radicaux libre sexcédant la concentration d'antioxydants nécessaires pour maintenir un équilibre et prévenir les dommages oxydatifs. l'excès de ROS est produit lors d'une concentration d'oxygène plus élevée ou lors qu'il ya eu hypoxie suivie d'une réoxygénation. Lors d'une grossesse, il se produit un stress oxydatif (**Jauniaux *et al.* , 2000**).

Le rôle du stress oxydatif serait donc notamment au niveau du remodelage de la matrice, de l'angiogenèse, de la migration et de la prolifération des cytotrophoblastes (**Genbacev *et al.* ,1997 et Charnock *et al.*, 2000 et Chen *et al.* , 2003**). Le marqueur du stress oxydatif le plus connu est la Peroxydation lipidique. La peroxydation lipidique se produit lorsque le radical hydroxyle.

La réduction du stress oxydant par l'activité de la GPx-3 protège également contre les modifications post-traductionnelles du fibrinogène par les oxydants dérivés du ROS et du NO qui augmentent sa thrombogénicité. Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre la production d'espèces oxydantes, tels que les radicaux libres et les peroxydes, et leur élimination par des systèmes de défenses antioxydantes.

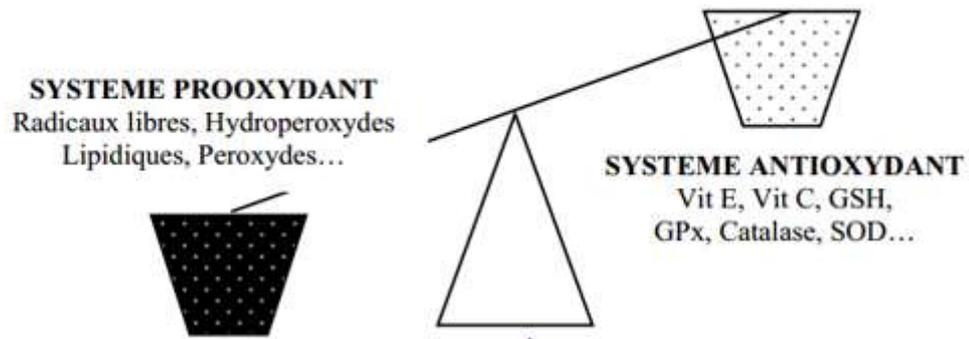


Figure 2: Déséquilibre du statut pro/anti oxydant en faveur d'un stress

VI. ELABORATION DES AMORCES

VI.1. Les amorces :

VI.1.1. Définitions des amorces

Les amorces sont des courtes séquences oligonucléotidiques d'ADN monocaténaire, utilisées lors des PCR pour borner l'amplicon.

Les amorces utilisées ont une longueur de 16-30 nucléotides ce qui demande une température d'hybridation raisonnable élevée. L'extrémité 3' de l'amorce devrait être riche en base G et C pour une meilleure hybridation.

VII. Définition de PCR :

La PCR permet d'amplifier des séquences autour des sites de mutations en quantités suffisantes pour réaliser l'analyse par RFLP, le concept technologique de la réaction de polymérisation en chaîne (polymerase chain reaction ou PCR), découvert par Kary Mullis en 1983 (Mullis *et al.*, 1987). La PCR est une méthodologie hautement sensible et spécifique pour la détection des acides nucléiques, son usage s'est considérablement étendu à de nombreuses applications, dont l'analyse quantitative d'acides nucléiques spécifiques (ADN et ADNc) dans un échantillon donné.

Une réaction en chaîne au cours de laquelle les produits issus d'un cycle d'amplification servent de matrice pour le cycle suivant. Ainsi, la réaction en chaîne qui s'établit par la répétition des cycles de dénaturation-hybridation-élongation.

Cette technique a progressé avec l'introduction d'une ADN polymérase qui peut générer une grande quantité d'un segment spécifique de l'ADN.

VII.1. Le but de la PCR :

Le but de la PCR est de reproduire partiellement in vitro le mécanisme de réplication naturel de l'ADN au lieu de répliquer un génome complet et d'obtenir des millions de copies d'une séquence d'ADN.

VII.2.Principe de la PCR :

Son principe consiste à obtenir un très grand nombre de copie d'une séquence d'ADN choisie, elle est basée sur le mécanisme de la réplication de l'ADN in vivo: l'ADN bicaténaire est déroulé en ADN monocaténaire, puis dupliqué et «réenroulé». Cette technique comprend les cycles répétitifs suivants :

VII.2.1.La dénaturation :

C'est la séparation des deux brins d'ADN obtenue par élévation de la température de 94 °C.

VII.2.2.L'hybridation :

En abaissant la température, les amorces spécifiques s'hybrident sur les molécules simples brin d'ADN. Les amorces sont constituées de courtes séquences d'ADN complémentaires de la séquence de l'ADN à amplifier.

Il s'agit toujours d'un couple d'amorces, complémentaire encadrant le fragment d'ADN à amplifier.

VII.2.3L'élongation :

C'est la synthèse du brin complémentaire, elle se fait par addition de nucléotides à partir des amorces en utilisant l'ADN polymérase comme catalyseur en présence d'ions Mg^{2+} .

Matériel et méthodes

I. Conception des amorces pour la PCR

Lors de la conception d'un ensemble d'amorces à une région spécifique de l'ADN pour l'amplification, une amorce doit être orientée dans le sens 5' → 3', l'autre amorce doit compléter le brin moins, elle est orientée dans le sens 3' → 5' (Albert *et al.*, 1990)

La conception des amorces est sans doute le paramètre le plus important pour le succès de la PCR, une amorce mal conçue peut empêcher le fonctionnement de la réaction PCR. La séquence d'amorce détermine plusieurs paramètres, telles que la position et la longueur du produit, sa température de fusion et finalement le rendement (Innis et Gelfan, 1994).

Les caractéristiques qui devraient être considérées lors de la conception des amorces sont: La longueur de l'amorce, qui doit être comprise entre 15-30 résidus nucléotidiques (bases). La teneur optimale en GC devrait se situer entre 40-60%.

L'extrémité 3' des amorces devrait contenir un G ou C.

Températures de fusion optimales (T_m) des amorces entre 52-58°C.

Di-nucléotidiques répétitions (par exemple, ou GCGCGCGCGC ATATATATAT).

II. Sélection des amorces

Plusieurs variables doivent être prises en considération lors de la conception des amorces pour la PCR. Les plus importantes sont :

II.1. La longueur de l'amorce

Ce paramètre est essentiel pour le succès de la PCR. En général, les oligonucléotides entre 18 et 24 bases sont spécifiques de la séquence.

La longueur de l'amorce est également proportionnelle à l'efficacité de l'hybridation l'objectif est de concevoir une amorce dont la température d'hybridation est d'au moins 50 °C plus l'amorce est longue, moins l'hybridation est efficace. Le nombre de matrices amorcées diminuant à chaque étape, cela peut aboutir à une diminution sensible de produit amplifié.

II.2. Température de fusion (T_f)

En général, une température de fusion de 55–72 °C donne les meilleurs résultats, elle correspond à une longueur d'amorce de 18–24 bases. Les deux amorces d'oligonucléotides doivent être conçues de sorte qu'elles aient des températures de fusion semblables.

II.3. Spécificité

La spécificité de l'amorce dépend au moins partiellement de la longueur de l'amorce. Il est évident qu'il y a beaucoup plus d'oligonucléotides uniques à 24 paires de bases qu'à 15 paires de bases.

Les amorces doivent être choisies de telle sorte qu'elles aient une séquence unique dans l'ADN matrice qui doit être amplifié, une température de fusion de 55–72 °C donne les meilleurs résultats. Une amorce conçue avec une séquence hautement répétitive conduira à une traînée lors de l'amplification d'ADN génomique.

II.4. Séquences d'amorce complémentaire

Les amorces doivent être conçues absolument sans aucune homologie intra-amorce au-delà de 3 paires de bases. Si une amorce possède une telle région d'auto-homologie, des structures partiellement doubles brin en «épingles à cheveux»

Un autre risque connexe est l'homologie inter-amorce. L'homologie partielle dans les régions centrales de deux amorces peut interférer avec l'hybridation. Si l'homologie se situe à l'extrémité 3' de l'une ou de l'autre amorce, la formation de dimères d'amorce se produira, ce qui, par compétition, empêchera le plus souvent la formation du produit désiré.

II.5. Teneur en G/C et suites polypyrimidine (T, C) ou polypurine (A, G)

La séquence d'amorce doit être choisie de telle sorte qu'il n'y ait aucune suite poly-G ou poly-C pouvant promouvoir une hybridation non spécifique.

Les suites polypyrimidine (T, C) et polypurine (A, G) devraient également être évitées. Idéalement, l'amorce présentera un mélange presque aléatoire de nucléotides, une teneur de 50 % en GC et une longueur d'environ 20 bases. (Dieffenbach et al., 1995).

II.6. Séquence à l'extrémité 3'

Il est établi que la position terminale 3' dans les amorces PCR est essentielle pour empêcher le désamorçage, Le problème des homologies d'amorce se produisant dans ces régions a déjà été reporté

III. La séquence du Gène GPX3

La séquence du gène GPx3 a été extraite depuis la base de données db SNP de NCBI via le site (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>)

dbSNP est une archive publique de toutes les variations de séquences courtes, et pas seulement des substitutions nucléotidiques dbSNP a été créé en septembre 1998, il définit des variantes de nucléotide unique. Cette base de données comprend une large collection de variations génétiques simples telles que les substitutions de nucléotides à base unique.

Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs8177404

RefSNP	Allele	HGVS Names
Organism: human (<i>Homo sapiens</i>)	Variation Class: SNV: single nucleotide variation	NC_000005.10.g.151020023T>C NC_000005.9.g.150399504T>C
Molecule Type: Genomic	RefSNP Alleles: C/T (P) (V)	NM_001329790.1.c.-632T>C NM_002004.4.c.-632T>C
Created/Updated in build: 117/150	Allele Origin:	XR_944410.2.n.307A>G
Map to Genome Build: 108/Weight 1	Ancestral Allele: C	
Validation Status:	Variation Viewer:	
Citation: PubMed	Clinical Significance: N/A	
	MAF/MinosAlleleCount:	C=0.1567705 (1000 Genomes) C=0.16904920 (TOPMED)

SNP Details are organized in the following sections:
[GeneView](#) [Map](#) [Submission](#) [Fasta](#) [Resource](#) [Diversity](#) [Validation](#)

[Integrated Maps \(Hint: click on 'Chr Pos' to see variant in the new NCBI variation viewer\)](#)

[GeneView](#)

GeneView via direct link using RefSeq coordinates (read when an new model is available) MB

Figure 3: Plateforme de dbSNP

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp.cgi?rs=rs8177404

ss2279285.184 HUMAN_LONGEVITY(HLI)-5-151020023-T/C fwd/ C/T ttctacaggcatgctcagctgtga cttatgatggggagaaaggcacc 11/18/16 11/18/16
 ss2447503385 TOPMEDJ5_150399684_T/C fwd/ C/T ttctacaggcatgctcagctgtga cttatgatggggagaaaggcacc 11/20/16 11/20/16

Fasta sequence (Legend)

```
>gnl|dbSNP|rs8177404|allelePos=501|totalLen=1001|taxid=9606|snpclass=1|alleles='C/T'|mol=Genomic|build=150
TGTAGGACC TGTGCCGGT GGTGATATG GGGCCATTC TCAAAGACT COTGGTCTC
GTCTGTCACT TACCTTAAAG ACGAGTCATC TAGCCAGAGC CAGAAAGGCA CTGGAGATC
CTAATCAATC CCATCATTAC ATAGCTGAGG AACTGTAGGC CCAGAGAGTA ACTGCAACAT
GTTAAGACT ACACAGGGAG CAATTTTAT TTCTGCTTCT AAGCCAGSTG GTTTGGCCAC
AGTAGGCCA AGAAGATAC GACAGAGCAA GCTTGTCTGG GTTCCCACT CAGTTTATTA
CTATTAGCC ATPOCCITTT TCCCCTCA CAITTTCTGG CATTCCATG GTCTTGATG
AATCTAAGC TAAATATGA GTTTCTCTG AGTCTTTGG TCTTCATTC TGAAGACTCT
CACTGTACAG AAAACTTTAA TTAATATAT GCTTATGCTT TTCTCTGCT AACITTTTC
TACAGGCATG TCAGCTGTGA
Y
CCTTATGATG GGGAGGAAG GCAOCCAC CTTCTGTCC CTACAGTCT AATGCCCTAC
CCAGAA789G GTTTTCRAAA TCCAGAGCA CCGACTCTTT GTTCTTAAE CACTAAGCT
ATATATAGTA AATGTTTCTG GAGGTTTAA CTTAGCTCTT GCTGAATTT TAAACCTCA
ATTTCCAGAG GACACTGACC AGSTGTTTT AAAACCTGGA TGGGATAAG AAATGCTTCC
CAGAA789G ACTTCCATCA GTCTAGGGA GCTATTAGCC CCGTTGGCT GCTGTAAATG
GAGCCGCTG TGTCTGCC CTTTGGCACT TTGGAGCAA AAGAGGAAG GACCGCTCC
CAGTCCAGCA GGGACTGAC TTCCACTCT CTGCCAGAT TTGCTTATG CACTGTGSC
CCGGAGCGG GAGGTGGGA GCTGAGGCA AGTGTGSCC GCOCTGAAA TCCAGGSCC
CTAGCAATG GCTGAGGGA
```

NCBI Resource Links

Submitter-Referenced [dbSNP Blast Analysis](#)

GenBank [NT_029285.10](#)

Population Diversity (Alleles in RefSNP orientation) . See additional population frequency from 1000Genome [here](#)

ss#	Sample Ascertainment				Genotype Detail				Alleles	
	Population	Individual Group	Chrom. Sample Cnt.	Source	C/C	C/T	T/T	HWP	C	T

Figure 4: La séquence de polymorphisme rs 8177404

IV. Le polymorphisme rs8177404 de gène GPx3

Le séquençage de 581 pb de la région du promoteur du gène GPx3 a permis de mettre en évidence 10 SNP connus

(rs8177403, Rs8177404, rs8177405, rs181590329, rs61381043, rs8177406, rs8177407, rs8177408, rs8177409, rs6888961) Parmi les 10 loci polymorphes, on a choisi le rs8177404 qui est localisé sur le gène GPx3 constitué d'une substitution d'un nucléotide C (cytosine) en T (tymine), il a été associé précédemment au syndrome métabolique et a une augmentation du risque de maladie cardio-vasculaire.

V. L'outil primer3

C'est un logiciel de conception d'amorces ou de sondes utilisé pour la sélection d'amorces.

Les composants les plus visibles de Primer3 sont le WebInterfaces, primer3plus

(<http://primer3plus.com>) (Untergasser et al.,2007) et Primer3web (<http://primer3.wi.mit.edu>) ainsi que le programme de conception d'amorce Primer3 qui peut effectuer plusieurs types de tâches de conception, il permet de trouver les séquences des amorces à utiliser lors de la réalisation d'une PCR et d'étudier plus en détail ces amorces, notamment de savoir si elles ne s'hybrident pas sur elles-mêmes ou entre elles. Il Permet également de donner la localisation de la région d'hybridation des amorces et la taille de l'amplicon obtenu ainsi que la séquence du couple d'amorces trouvé.

VI. Les étapes de primer3 :

Étape 1 :

Copier la séquence sélectionnée dans la fenêtre ou rentrer son code d'identification.

Recherchent les deux amorces

Étape 2 :

Renseigner la position du nucléotide du départ de l'amplification et la taille maximale de l'amplicon souhaité

Étape 3 :

Supprimer les intervalles non souhaités

Étape 4 :

Utiliser les paramètres par défaut des amorces ou les vérifier à l'aide du logiciel Perl Primer (taille, T_m °C)

Primer3 (v. 0.4.0) Pick primers from a DNA sequence.	Checks for mispriming in template.	disclaimer	Primer3 Home
	Primer3plus interface	cautions	FAQ/WIKI

There is a newer version of Primer3 available at <http://primer3.ut.ee>

Paste source sequence below (5'→3', string of ACGTNacgtn -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored). FASTA format ok. Please N-out undesirable sequence (vector, ALUs, LINEs, etc.) or use a [Mispriming Library](#) (repeat library):

```

CTATTAGACC ATTCCCTTII TCCCGACTCA CAITTCIBGG CAITTCGATG GTCTICATAG
AATCTAAGCC TAAAAATAGA GTTTTCCTTG AGTCCTTIBGG TCTTCGTTTC TGAAGACTCC
CATCTCICAG AAAACTTTAA TTAATTAAT GSTATGCTT TCTCTTCTCT AACCTTTTC
TACAGGCATG TCAGCTGTA Y(C/T)CCTTATGAG GGGAGGAAG GACCCCCACC TTCCTGTC CTACAGTCTT AATGCGCTAC
CCGAAATGG GTTTTCAAA TCCCGSACA CCGCTCTTT GTTTCCTTAG CACTAAGCTT
AGTATAGTA AATGTTCTG GAGTTTAC TCCAGTCTT GCTGAAATT TAAAGCTCA
ATTCCAGAG GACCATGCG AGSTGTTTT AAAAGCTGSA TAGGAATAG AATGCTTCC
    
```

<input type="checkbox"/> Pick left primer, or use left primer below:	<input type="checkbox"/> Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below:	<input type="checkbox"/> Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on opposite strand):

Sequence Id A string to identify your output.

Targets: E.g. 50,2 requires primers to surround the 2 bases at positions 50 and 51. Or mark the [source sequence](#) with [and] ; e.g. ...ATCT[CCC]TCAT.. means that primers must flank the central CCC.

Excluded Regions: E.g. 401,7 68,3 forbids selection of primers in the 7 bases starting at 401 and the 3 bases at 68. Or mark the [source sequence](#) with < and > ; e.g. ...ATCT<CCC>TCAT.. forbids primers in the central CCC.

Product Size Ranges:

<input type="text" value="Number To Return: 5"/>	<input type="text" value="Max 3' Stability: 9.0"/>
<input type="text" value="Max Repeat Mispriming: 12.00"/>	<input type="text" value="Pair Max Repeat Mispriming: 24.00"/>
<input type="text" value="Max Template Mispriming: 12.00"/>	<input type="text" value="Pair Max Template Mispriming: 24.00"/>

Figure 5: Interface de l'outil Primer3

Résultats et perspectives

I. Résultats de la conception des amorces :

I.1. obtention de la séquence d'intérêt :

La séquence de la région d'intérêt encadrant le polymorphisme Rs8177404 a été obtenue en utilisant la base de données SNP

Nous avons consulté l'ensemble des SNP de gène *GPx3*, puis nous avons configuré le menu de la base de données, de telle sorte à avoir le maximum d'informations sur le polymorphisme Rs8177404, la nature du polymorphisme qui est une substitution d'un nucléotide de type C (cytosine) en T (thymine).

I.2. conception des amorces

L'utilisation de l'outil primer 3 pour le polymorphisme rs 8177404 de gène *GPx3* a permis d'obtenir cinq couples d'amorces

Des produits de PCR de plus de 2000 pb pourraient être difficiles à séquencer, la concentration d'ADN devenant un facteur limitant. En effet plus un produit de PCR est long plus sa concentration doit être élevée pour obtenir un résultat de séquençage satisfaisant. La température d'hybridation des amorces est de 60°C

La longueur des amorces optimales obtenues est de 20 nucléotides (figure6). En général plus l'amorce est longue, moins l'hybridation est efficace. Le fragment utilisé contient 1004pb ces amorces donnent un produit de 243pb, ces amorces ont une teneur GC de 45 à 55%, leur température d'hybridation est de 59.87 et 59.95°C respectivement.

Les couples d'amorces de la séquence de SNP rs 8177404 :

L'amorce gauche 5'CACTCACATTTCTGCGCATT3'

L'amorce droite 5'TGGGTAGGGCATTAGGACTG3'


```

ADDITIONAL OLIGOS
      start  len  tm  gc%  any  3'  seq
1 LEFT PRIMER      325  20  59.87  45.00  6.00  2.00  CACTCACATTTCTGCGCATT
  RIGHT PRIMER     573  20  59.78  50.00  3.00  2.00  CCATTCTGGGTAGGGCATT
  PRODUCT SIZE: 249, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

2 LEFT PRIMER      330  20  60.48  40.00  6.00  2.00  ACATTTCTGCGCATTCCAT
  RIGHT PRIMER     579  20  60.05  50.00  5.00  1.00  AAAACCCCATTTCTGGGTAGG
  PRODUCT SIZE: 250, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

3 LEFT PRIMER      330  20  60.48  40.00  6.00  2.00  ACATTTCTGCGCATTCCAT
  RIGHT PRIMER     567  20  59.95  55.00  2.00  1.00  TGGGTAGGGCATTAGGACTG
  PRODUCT SIZE: 238, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

4 LEFT PRIMER      325  20  59.87  45.00  6.00  2.00  CACTCACATTTCTGCGCATT
  RIGHT PRIMER     570  20  59.52  50.00  2.00  0.00  TTCTGGGTAGGGCATTAGGA
  PRODUCT SIZE: 246, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

Statistics
      con  too  in  in  no  tm  tm  high  high  high
      sid many tar excl bad GC too too any 3' poly end
      ered  Ns get reg GC% clamp low high compl compl X stab ok
Left  4353  1  0  0  150  0  1932  1127  0  24  0  64  1055
Right 4102  0  0  0  111  0  1073  2035  0  0  0  84  799
Pair Stats:
considered 5037, unacceptable product size 5023, ok 14
primer3 release 1.1.4

(primer3_results.cgi release 0.4.0)

```

Figure 7: Résultats de 4 séquences qui sont restent

Parmi les cinq couples d'amorces spécifiques obtenus, le logiciel a choisi les amorces optimales en prenant en considération la longueur du produit obtenu, la teneur en GC mais surtout les températures d'hybridation des amorces, qui doivent être des plus proches.

II. Confirmations des résultats:

Afin de nous assurer de la qualité des résultats obtenus, et de la fonctionnalité des amorces obtenus, nous avons réalisé une PCR virtuelle, en utilisant l'outil UCSC de l'université de Californie (<http://genome.ucsc.edu/>)

Les résultats obtenus, ont d'abord confirmé la taille du produit d'amplification obtenu, en effet le produit obtenu est de 243pb, comparable à celui obtenu en utilisant l'outil bioinformatique Primer3.

L'utilisation d'UCSC nous a permis également de confirmer, la spécificité des amorces conçues, le résultat obtenue représente un fragment unique, les informations obtenues en marge, confirment également le chromosome porteur du gène *GPx3*, la séquence des amorces et la température d'hybridation (Figure 8)

UCSC In-Silico PCR

Genome: Human
Assembly: Dec. 2013 (GRCh38/tg38)
Target: genome assembly
Forward Primer: TACTCACATTCTGCGCATT
Reverse Primer: TGGTAGGCATTAGGACTG
submit

Max Product Size: 4000
Min Perfect Match: 15
Min Good Match: 15
Flip Reverse Primer:

About In-Silico PCR

In-Silico PCR searches a sequence database with a pair of PCR primers, using an indexing strategy for fast performance.

Configuration Options

Genome and Assembly - The sequence database to search.
Target - If available, choose to query transcribed sequences.
Forward Primer - Must be at least 15 bases in length.
Reverse Primer - On the opposite strand from the forward primer. Minimum length of 15 bases.
Max Product Size - Maximum size of amplified region.
Min Perfect Match - Number of bases that match exactly on 3' end of primers. Minimum match size is 15.
Min Good Match - Number of bases on 3' end of primers where at least 2 out of 3 bases match.
Flip Reverse Primer - Invert the sequence order of the reverse primer and complement it.

Output

When successful, the search returns a sequence output file in fasta format containing all sequence in the database that lie between and include the primer pair. The fasta header describes the region in the database and the primers. The fasta body is capitalized in areas where the primer sequence matches the database sequence and in lower-case elsewhere. Here is an example from human:

Figure 8: Utilisation du site (<http://genome.ucsc.edu/>)

Conclusion et perspectives :

Compte tenu du rôle prépondérant que joue la réaction de polymérisation en chaîne PCR dans la biologie moléculaire, il s'avère plus qu'important d'élaborer des amorces, qui soient le plus spécifiques et le moins biaisé possible quant à la qualité d'hybridation qu'à la température utilisée.

C'est dans ce sens que nous avons jugé intéressant, de concevoir des amorces pour le polymorphisme rs 8177404 du gène *GPx3*, un gène dont le produit joue un rôle reconnu dans la survenue du syndrome métabolique

L'étude de la variation génétique au niveau de ce gène, et notamment le polymorphisme rs8177404, consiste à utiliser des amorces afin d'amplifier la région encadrant ce polymorphisme, ceci représente une étape préalable, et indispensable à toute analyse de biologie moléculaire impliquant ce polymorphisme (PCR/Séquençage, RT/PCR ...).

Nous avons élaboré grâce à ce travail, un couple d'amorce qui encadre le polymorphisme SNP rs 8177404 du gène *GPx3* associé au syndrome métabolique qui est considéré comme préfigurant plusieurs maladies graves. Le polymorphisme rs 8177404 n'ayant pas fait l'objet d'études au sein de notre population, pourra faire l'objet dans l'avenir d'une étude d'association avec la survenue du syndrome métabolique ou d'autres désordres de l'ordre cardio-métabolique, une étude dans laquelle la répartition des allèles du polymorphisme rs8177404, doit être comparée entre le groupe des cas (porteurs de la maladie) et le groupe des témoins (contrôles), afin de mettre en évidence une éventuelle association statistiquement significative, entre les allèles de ce polymorphisme et la survenue du syndrome métabolique

Référence Bibliographique

A

Albert, J., Fenyo, E. M. Simple sensitive and specific detection of human immunodeficiency virus type 1 in clinical specimens by polymerase chain reaction with nested primers. *J. Clin. Microbiol.* (1990); **28**, 1560-1564

Alexander, Selenium, in Handbook on the Toxicology of Metals (Fourth Edition).San Diego. 2015, 1175-1208.

B

Bhabak KP, Mugesh G "Functional mimics of glutathione peroxidase: bioinspired synthetic antioxidants". *Accounts of Chemical Research.* Nov 2010; 43 (11): 1408–19.

Bjornstedt M., Xue J. Y., Huang W. H., Akesson B. andHolmgren A. The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* 1994;269:29382 – 29384

Brigelius-Flohé R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Rad. Biol. Med.* 1999; 27, 951–96

BrigeliusFloheR,AumannKD,BlockerH,GrossG,KiessM,KloppelKD,MaiorinoM,RoveriA,SchuckeltR,UrsiniF,WingenderE,FlohéL."Phospholipid-hydroperoxideglutathioneperoxidase.GenomicDNA,cDNA ,and deducedamino acid séquence." *JBiolChem*,1994;269:7342-7348

C

Carlson BA, Yoo MH, Sano Y, Sengupta A, Kim JY, Irons R, et al. Selenoproteins regulate macrophage invasiveness and extracellular matrix-related gene expression. *BMC Immunol.* 2009;10:57.

Charnock-JonesDS,Burton GJ."Placental vascular morphogenesis." *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.*2000; 14:953-968

Chen B, Rao X, House MG, Nephew KP, Cullen KJ, Guo Z. GPx3 promoter hypermethylation is a frequent event in human cancer and is associated with tumorigenesis and chemotherapy response. *Cancer Lett.* Oct 2011; 309(1):37–45

Chen CP, Aplin JD. "Placental extracellular matrix: Gène expression, déposition By placental fibroblasts and the effect of oxygen." *Placenta*, 2003; 24:316-325

D

D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J. (Eds.) *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. London: CRC Press, pp. 5–11.

F

Ferré, F. () Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth. *PCR Methods Appl.* 1992 ; 2, 1–9

Fiaschi T, Chiarugi P. Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: a diabolic liaison. *International journal of cell biology.* 2012;2012:762825

G

G Gasche C, Chang CL, Rhee J, Goel A, Boland CR. Oxidative stress increases frameshift mutations in human colorectal cancer cells. *Cancer Res.* 2001; 61:7444–7448

Genbacev O, Zhou Y, Ludlow J W, Fisher SJ. "Régulation of human placental Development by oxygen tension." *Science*, 1997; 277:1669-1672

H

Howie A. F., Walker S. W., Akesson B., Arthur J. R. and Beckett G. J.) Thyroidal extracellular glutathione per-oxidase: a potential regulator of thyroid-hormone synthesis. *Biochem. J.* 1995; 308:713 – 717

J

Jauniaux E, Watson AL, Empstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ. "Onset Of maternal arterial bloodflow and placental oxidative stress; a possible factor in Human early pregnancy failure." *Am J Pathol*, 2000; 157:2111-2122

K

Kiremidjian-Schumacher L, Roy M, Wishe HI, Cohen MW, Stotzky G. Regulation of cellular immune responses by selenium. *Biol Trace Elem Res*. 1992 Apr-Jun;33:23–35.

L

LACOLLEY P., - *Biologie Et Pathologie Du Cœur Et Des Vaisseaux*. Ed. John Libbey Eurotext, Paris. 2007 ; 677p

M

Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Mizuno K, Matsuzawa Y, Matsubara K. Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue. *Gene*. 1997 May 6;190(2):227–35

Mirochnitchenko O, Palnitkar U, Philbert M, and Inouye M. (1995) Thermosensitive phenotype of transgenic mice overproducing human glutathione peroxidases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8120 – 8124

Morrison, T., Weis, J.J. and Wittwer, C.T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*, 1998;24, 954–962.

Müller C., Winkler K., Brigelius-Flohé R. 3'-UTRs of glutathione peroxidases differentially affect selenium-dependent mRNA stability and selenocysteine incorporation efficiency. *Biol. Chem.* 2003;384, 11–18

Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, Richardson A, Van Remmen H "Trends in oxidative aging theories". *Free Radical Biology & Medicine*. Aug 2007; 43 (4): 477–50.

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987 ; 155 : 335-50

Murawaki Y, Tsuchiya H, Kanbe T, Harada K, Yashima K, Nozaka K, et al. Aberrant expression of selenoproteins in the progression of colorectal cancer. *Cancer Lett.* 2008 Feb 8;259(2):218–30

O

Overbergh,L., Valckx,D., Waer,M. and Mathieu,C. Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokines*,1999; 11,305–312.

P

Papp, L.V., et al., From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal*, 2007. 9(7): p. 775-806.

Pavrides S, Tsirigos A, Migneco G, Whitaker-Menezes D, Chiavarina B, Flomenberg N, Frank PG, Casimiro MC, Wang C, Pestell RG, Martinez-Outschoorn UE, Howell A, Sotgia F, Lisanti MP. The autophagic tumor stroma model of cancer: Role of oxidative stress and ketone production in fueling tumor cell metabolism. *Cell cycle*. 2010;9:3485–3505.

Pfaffl,M.W. Development and validation of an externally standardised quantitative insulin like growth factor-1 (IGF-1) RT–PCR using LightCycler SYBR[®] Green I technology. In Meuer,S., Wittwer,C. and Nakagawara,K. (eds), *Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications*. Springer Press, Heidelberg, Germany 2001;pp. 281–291

R

Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G. et Hoekstra, W.G.

Selenium : biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*. 1973;179 (4073) : 588-590

T

Tang,L., K. Gounaris, C. Griffiths and M. E. Selkirk"Heterologous expression and enzymatic properties of a selenium-independentglutathione peroxidase from the parasitic nematode *Brugia pahangi*." *J Biol Chem*.1995; 270(31): 18313-8

Tham DM,Whitin JC, Kim KK, Zhu SX, Cohen HJ. Expression of extracellular glutathione peroxidase in human and mouse gastrointestinal tract. *Am J Physiol.* 1998 Dec;27:G1463–71.

U

Untergasser,A., Nijveen,H., Rao,X., Bisseling,T., Geurts,R. and Leunissen,J.A. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3.*Nucleic Acids Res* 2007;35, W71–W74

Ursini F., Maiorino M. and Gregolin C. The selenoen-zyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase.*Biochim. Biophys. Acta*1985;839:62–70

W

Wang,A.M., Doyle,M.V. and Mark,D.F. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* , 1989; 86, 9717–9721

WhitinJC,BhamreS,ThamDM,CohenHJ."ExtracellularglutathionePeroxidase issecreted basolaterallybyhumanrénalproximaltubulecells."*AmJ PhysiolRénalPhysiol*,2002;283:F20-28

Wolin, M.S., Plasma glutathione peroxidase activity is potentially a key regulator of vascular disease-associated thrombosis. *Circulation*, 2011; 123(18): p. 1923-24

Y

Yamamoto Y., Nagata Y., Niki E., Watanabe K. andYoshimura S. Plasma glutathione peroxidase reducphosphatidylcholine hydroperoxide. *Biochem. Biophys. Res.Comm.* 1993;193:133 – 138

Yu G., Tseng G. C., Yu Y. P., Gavel T., Nelson J., Wells A., Michalopoulos G., Kokkinakis D., Luo J. H. (2006) CSR1 suppresses tumor growth and metastasis of prostate cancer. *Am. J. Pathol.* 2006; 168, 597–607

Yu Y. P., Yu G., Tseng G., Cieply K., Nelson J., Defrances M., Zarnegar R., Michalopoulos G., Luo J. H. Glutathione peroxidase 3, deleted or methylated in prostate cancer, suppresses prostate cancer growth and metastasis. *Cancer Res.* 2007;67, 8043–8050

Z

Zhang X., Yang J. J., Kim Y. S., Kim K. Y., Ahn W. S., Yang S. (2010) An 8-gene signature, including methylated and down-regulated glutathione peroxidase 3, of gastric cancer. *Int. J. Oncol.* 2010; 36, 405–414

Résumé

La glutathion peroxydase GPX constitue le système enzymatique anti-oxydant principal. Elle catalyse la réduction d'une grande variété d'hydroperoxydes tels les hydroperoxy des d'acides gras et le peroxyde d'hydrogène, par l'intermédiaire du glutathion et protège ainsi les cellules des mammifères contre le stress oxydatif, parmi les glutathions peroxydases on retrouve le gène *GPX3* localisé dans la région q32 du chromosome 5

Dans ce travail nous allons concevoir, avec spécificité un couple d'amorce encadrant le rs8177404 du gène *GPX3* afin de pouvoir réaliser par la suite, des études d'association génétique impliquant le polymorphisme rs8177404.

L'utilisation de l'outil Primer3 nous a permis d'obtenir un couple d'amorces d'une longueur de 20 nucléotides, qui encadre la région d'intérêt, et qui donne un produit d'amplification de 243pb. La PCR in-Silico, réalisée grâce à l'outil UCSC, nous a permis de confirmer les résultats obtenus.

Ce travail représente une étude préalable et indispensable à toute analyse de biologie moléculaire, qui a pour but d'étudier l'implication d'un polymorphisme génétique dans la survenue d'une pathologie associée.

Mots clés : Gène *GPX3*, rs 8177404, amorce

Summary

Glutathione peroxidase GPX is the main antioxidant enzyme system. It catalyses the reduction of a wide variety of hydroperoxides such as fatty acid hydroperoxides and hydrogen peroxide, via glutathione and thus protects mammalian cells against oxidative stress, among the glutathione peroxidases, we finds the *GPX3* gene, localized in q32 region of chromosome 5 In this work we will design, with specificity, a pair of primers framing the rs8177404 of the gene *GPX3* in order to be able to realize thereafter, genetic association studies involving the polymorphism rs8177404.

The use of the Primer3 tool allowed us to obtain a pair of primers with a length of 20 nucleotides, which frames the region of interest, and which gives a 243 bp amplification product. The in-Silico PCR, carried out using the UCSC tool, enabled us to confirm the results obtained.

This work represents a preliminary study and indispensable step to any analysis of molecular biology, which aims to study the implication of a genetic polymorphism in the occurrence of an associated pathology.

Key words: *GPX3* gene, rs 8177404, primer

ملخص

GPX3 الجلوتاثيون بيروكسيداز هو نظام إنزيم مضاد للأكسدة الرئيسية. هو يحفز للحد من مجموعة متنوعة من hydroperoxides مثل الأحماض الدهنية hydroperoxy وبيروكسيد الهيدروجين بفضل الجلوتاثيون، يحمي خلايا الثدييات ضد الأكسدة. و من بين بيروكسيداز الجلوتاثيون توجد الجينات *GPX3* في المنطقة Q32 من كروموزوم 5. في هذا العمل سوف نقوم بتصميم زوج معين من rs8177404 من أجل تحقيق بعد ذلك الدراسات الوراثية المشتركة و التي تنطوي على بوليموغيزم rs 8177404 .

استخدام أداة Primer3 سمح لنا بالحصول على بضع (أمورس) بطول 20 النيوكليوتيدات التي تقع على حدود المنطقة المدروسة، ويعطي المنتج من 243pb. و مكننا PCR داخل السيليكو، المحقق من خلال أداة UCSC بالتأكد من النتائج. هذا العمل يمثل لأول مرة، لا غنى عنها لأية دراسة تحليل البيولوجيا الجزيئية، الذي يهدف إلى دراسة إشراك تعدد الأشكال الجيني في بداية حالة الأمراض المرتبطة بها الكلمات المفتاحية *GPX3* . الجينات rs8177404, قطعة