



République Algérienne Démocratique et populaire Ministère
de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITÉ DE TLEMCEEN - ABOU-BEKRBELKAÏD

FACULTÉ SNV-STU- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

LABORATOIRE DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE APPLIQUÉE ET IMMUNOLOGIE - BIOMOLIM

THÈSE

Présentée pour l'obtention du grade de

DIPLOME DE MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité Immunologie

Par :

Djihane BEDOUI

Soutenue le 08 septembre 2020

Intitulé

**Conception des amorces encadrant le gène *Fas* impliqué dans le processus
apoptotique dans l'immunité anti-tumorale**

_____ **Sous la direction de Docteur Nabila BRAHAMI** _____

Jury

Dr. EL-MEZOUR C

Université de Tlemcen, Algérie

Présidente

Dr. BRAHAMI N

Université de Tlemcen, Algérie

Dir de thèse

Dr. NOUARI W

Université de Tlemcen, Algérie

Examinatrice

08 septembre 2020



République Algérienne Démocratique et populaire Ministère
de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITÉ DE TLEMCEEN - ABOU-BEKRBELKAÏD

FACULTÉ SNV-STU- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

LABORATOIRE DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE APPLIQUÉE ET IMMUNOLOGIE - BIOMOLIM

THÈSE

Présentée pour l'obtention du grade de

DIPLOME DE MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité Immunologie

Par :

Djihane BEDOUI

Soutenue le 08 septembre 2020

Intitulé

**Conception des amorces encadrant le gène *Fas* impliqué dans le processus
apoptotique dans l'immunité anti-tumorale**

_____ **Sous la direction de Docteur Nabila BRAHAMI** _____

Jury

Dr. EL-MEZOUR C

Université de Tlemcen, Algérie

Présidente

Dr. BRAHAMI N

Université de Tlemcen, Algérie

Dir de thèse

Dr. NOUARI W

Université de Tlemcen, Algérie

Examinatrice

08 septembre 2020

Résumé

Introduction : Le récepteur de la mort Fas est connu depuis longtemps pour son rôle d'entraîner la mort de certains types cellulaires par apoptose via son interaction avec FasL. Ce type de mort cellulaire médié par Fas est important pour l'homéostasie de l'organisme et joue un rôle crucial dans l'immunité antitumorale via l'élimination des cellules cancéreuses.

Objectif : Concevoir soigneusement des amorces permettant d'encadrer la séquence à amplifier du gène *Fas* pour garantir la reproductibilité et l'efficacité de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

Matériels et méthodes : Nous avons utilisé des sites bio-informatiques pour concevoir des amorces optimales à la région que l'on veut amplifier du gène *Fas* qui correspond à l'exon 8 pour la réalisation d'une PCR. Nous avons commencé par extraire la séquence de ce gène à partir du site ensembl.org et nous avons fini par le choix de la bonne paire d'amorces. La longueur de l'amorce, les températures de fusion, la composition de la base, la complémentarité et les séquences 3' ont été déterminés.

Résultats : Nous avons obtenu un couple d'amorces spécifiques à la séquence d'intérêt, qui est le bloc 9 grâce à l'utilisation du logiciel Primer-BLAST.

Conclusions : À travers ce travail, nous avons facilité aux chercheurs de réaliser la technique PCR en concevant de bonnes amorces pour le gène *Fas* afin de mieux comprendre l'implication et le mécanisme de ce gène dans l'immunité anti-tumorale et confirmer son rôle.

Mots clés : Apoptose, Fas, FasL, amorce, immunité antitumorale, la PCR.

Abstract

Background : The death receptor Fas has long been known for its role in causing the death of certain cell types by apoptosis via its interaction with FasL. This type of Fas-mediated cell death is important for the body's homeostasis and plays a crucial role in anti-tumor immunity via the elimination of cancer cells.

Objective : Carefully design primers to frame the sequence to amplify of the *Fas* gene to ensure the reproducibility and efficiency of the polymerase chain reaction (PCR).

Materials and methods : We have used bioinformatics sites to design optimal primers for the desired region of the *Fas* gene which corresponds to exon 8 for performing PCR. We started by extracting the sequence for this gene from ensembl.org and ended up choosing the right pair of primers. Primer length, melting temperatures, base composition, complementarity and 3' sequences were determined.

Results : We obtained a primer pair specific to the sequence of interest, which is pair 9, through the use of Primer-BLAST software.

Conclusions : Through this work, we have made it easier for researchers to perform the PCR technique by designing optimal primers for the *Fas* gene to better understand the involvement and mechanism of this gene in anti-tumor immunity and to confirm its role.

Keywords : Apoptosis, Fas, FasL, primer, antitumor immunity, PCR.

ملخص

مقدمة : اشتهر مستقبل موت Fas منذ فترة طويلة بدوره في التسبب في موت أنواع معينة من الخلايا عن طريق موت الخلايا المبرمج من خلال تفاعله مع FasL. هذا النوع من موت الخلايا بوساطة Fas مهم لتوازن الجسم ويلعب دورًا حاسمًا في المناعة المضادة للأورام من خلال القضاء على خلايا الورم.

الهدف : تصميم البادئة بعناية لتأطير السلسلة المراد تضخيمها التابعة للجين Fas لضمان قابلية استنساخ وكفاءة تفاعل سلسلة البلمرة PCR.

الوسائل والطرق : لقد استخدمنا مواقع المعلوماتية الحيوية لتصميم بادئات مثالية للمنطقة المرغوبة من جين Fas الذي يتوافق مع إكسون 8 لعمل PCR. بدأنا باستخراج تسلسل هذا الجين من org.Ensembl وانتهى بنا المطاف باختيار الزوج المناسب من البادئات. تم تحديد طول البادئة، درجات حرارة الانصهار، تكوين القاعدة، التكامل والتسلسل '3.

النتائج : لقد حصلنا على زوج من البادئة خاص بالمنطقة المرغوبة، وهو الزوج 9، من خلال استخدام برنامج برايمر بلاست.

الاستنتاجات : من خلال هذا العمل، سهلنا على الباحثين أداء PCR من خلال تصميم بادئة جيدة لجين Fas من أجل فهم أفضل لمشاركة وآلية هذا الجين في المناعة المضادة للأورام وتأكيد دوره.

الكلمات المفتاحية : موت الخلايا المبرمج، LFas، Fas، البادئة، المناعة ضد الأورام، PCR.

Avant-propos

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie « BIOMOLIM », Université de Tlemcen, sous la direction du Professeur Mourad ARIBI. Je tiens à lui exprimer mes sincères remerciements pour son aide, ses précieux conseils, ses compétences scientifiques précieuses qu'il a toujours partagées avec nous. Je suis très chanceuse d'avoir étudié cette spécialité.

J'aimerais remercier ma directrice de thèse Dr. Nabila BRAHAMI qui m'a fait l'honneur de juger, d'évaluer mon travail et de m'avoir fait profiter de ses connaissances sur la biotechnologie. Je lui exprime ma profonde gratitude et mon respect.

Il me faut aussi remercier Dr. Wafa NOUARI pour son aide, son soutien, son écoute et surtout sa gentillesse.

Je voudrais également remercier les membres du jury d'avoir ausculter ma Thèse à savoir Dr. EL-MEZOUR et Dr. Wafa NOUARI.

Merci beaucoup à toute l'équipe du Laboratoire du « BIOMOLIM ».

Merci enfin à tous mes collègues qui m'ont aidé et m'ont donné un coup de main pour compléter ce travail. Sans vous ça aurait été beaucoup plus difficile. Je prends vraiment beaucoup de plaisir à passer du temps avec vous.

Mes derniers remerciements s'adressent à toute ma famille. Je remercie tout particulièrement mes parents et ma sœur, qui m'ont toujours aidé, soutenu et encouragé tout au long de mes études et, bien évidemment, de cette thèse qui sans leur soutien n'aurait pu être réalisée.

TABLES DES MATIÈRES

Résumé	iii
Abstract	iv
Résumé en Arabe	v
Avant-propos	vi
Table des matières	vii
Liste des figures	ix
Liste des tableaux	x
Liste des abréviations	xi
Introduction	1

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.1 Processus de l'apoptose	4
1.1.1 Définition	4
1.1.2 Changements biologiques et morphologiques	4
1.1.3 Les voies d'induction de l'apoptose	5
1.1.3.1 La voie extrinsèque	5
1.1.3.2 La voie intrinsèque	7
1.1.4 Régulation de l'induction de l'apoptose	9
1.1.5 Altération de l'apoptose	10
1.2 Fas	11
1.2.1 Gène Fas	11
1.2.2 Récepteur Fas	12
1.2.2.1 Définition/Structure	12
1.2.3 Ligand Fas	13
1.2.3.1 Définition/Structure	13
1.2.4 Apoptose médiée par l'interaction Fas/FasL	14
1.3 Fas et processus apoptotique dans l'immunité anti-tumorale	15
1.4 Réaction de polymérisation en chaîne	18
1.4.1 Principe	18
1.4.2 Les acteurs	19
1.4.3 Les étapes	19

1.4.4	Choix d'amorce	21
1.4.4.1	Définition	21
1.4.4.2	Caractéristiques de bonne amorce	21
1.5	Problématique et objectifs	23
1.5.1	Problématique	23
1.5.2	Objectif :	23
1.5.3	But	23
 Chapitre 2. Matériels et méthodes		
2.1.	Conception d'amorce.....	25
2.2.	Sélection des amorces.....	25
2.2.1.	La longueur de l'amorce.....	25
2.2.2.	Température de fusion.....	25
2.2.3.	La spécificité.....	25
2.2.4.	La complémentarité.....	26
2.2.5.	Contenu de l'amorce.....	26
2.2.6.	La séquence à l'extrémité 3'.....	26
2.3.	La séquence d'intérêt du gène Fas.....	26
2.4.	Le design des primers.....	27
2.5.	Les critères d'une bonne amorce.....	28
 Chapitre 3. Résultats		
3.1.	Résultats de la conception des amorces.....	30
3.2.	Interprétation des résultats.....	30
3.3.	Confirmation des résultats.....	31
 Chapitre 4. Conclusions.....		
Chapitre 5. Références bibliographiques.....		

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Les changements morphologiques de la cellule apoptotique	5
Figure 1.2. La voie apoptotique extrinsèque induite par la super-famille des récepteurs du TNF	7
Figure 1.3. La voie apoptotique intrinsèque	9
Figure 1.4. Les mécanismes impliqués dans la régulation de la voie apoptotique	10
Figure 1.5. Les facteurs responsables de la dérégulation de l'apoptose	11
Figure 1.6. Localisation du gène <i>Fas</i>	12
Figure 1.7. La structure du récepteur Fas et son ligand FasL	13
Figure 1.8. La voie de signalisation induite par l'interaction Fas/FasL	15
Figure 1.9. Elimination des cellules cancéreuses par l'interaction Fas/FasL	16
Figure 1.10. La résistance de la cellule tumorale à l'apoptose	18
Figure 1.11. La technique de la PCR	20
Figure 2.1. Base de données Ensembl	27
Figure 2.2. Mise en place de la séquence d'intérêt par le Primer-BLAST	28
Figure 3.1. Résultats du Primer-BLAST	30
Figure 3.2. Confirmation des résultats par In-Silico PCR	31

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1. Récepteurs de la mort et leurs ligands correspondants	6
Tableau 1.2. Les protéines de la famille Bcl-2	8
Tableau 1.3. Les différentes amorces du gène <i>Fas</i> et leurs utilisations	22
Tableau 3.1. La comparaison entre les critères d'une bonne amorce et notre amorce	31

LISTE DES ABRÉVIATION**A**

A : Adénine.

aa : Acide aminé.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

Ag : Antigène.

AIF : Facteur inducteur de l'apoptose.

Apaf-1 : Facteur d'activation de la protéase apoptotique.

APO-1 : Antigène apoptotique 1.

ApoBD : corps apoptotiques.

ARN : Acide ribonucléique.

B

Bad : Agoniste associée à BCL2 de la mort cellulaire.

Bak : Antagoniste / tueur homologue Bcl-2.

Bax : Protéine x associée à bcl-2.

Bcl-2 : Lymphome 2 à cellules B.

Bcl-w : Protéine 2 de type Bcl-2.

Bcl-XL : Protéine liée à la bcl-2, isoforme longue.

BH3 : Domaine 3 d'homologie Bcl-2.

Bid : Agoniste de la mort du domaine d'interaction BH3.

Bim : Protéine 11 de type Bcl-2.

BIR : Domaine IAP répété du baculovirus.

BLAST : Outil de recherche d'alignement local de base.

Bok : Tueur ovarien apparenté à Bcl-2.

C

C : Cytosine.

Caspase : Protéase spécifique de l'aspartate dépendante de la cystéine (protéase de l'acide cystéinyl aspartique).

CD95 : cluster de différenciation 95.

cFLIP : Protéine inhibitrice de FLICE cellulaire.

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité.

CSC : Cellule souche cancéreuse.

CRD : Domaine de reconnaissance des glucides.

D

dATP : Désoxyadénosine triphosphate.

dCTP : Désoxycytidine triphosphate.

DD : Domaine de mort.

DED : Domaine effecteur de mort.

dGTP : Désoxyguanosine triphosphate.

DIABLO : Protéine de liaison directe à la protéine inhibitrice d'apoptose (IAP) avec un faible PI).

DICE : Mort induite par l'élimination de Fas/FasL.

DISC : Complexe de signalisation inducteur de mort.

dNTP : Désoxynucléotide triphosphate.

DR : Récepteur de mort.

dTTP : Désoxythymidine triphosphate.

E

EndoG : Endonucléase G.

ER : Réticulum endoplasmique.

ERK : Kinase régulée par des signaux extracellulaires.

F

FADD : Domaine de la mort associé au Fas.

Fas : Fragment inducteur d'apoptose.

FasL : Ligand de Fas.

G

G : Guanine.

H

HtrA2/Omi : Exigence à haute température.

I

IAP : Protéine inhibitrice d'apoptose.

L

LTC : Lymphocyte T cytotoxique.

M

MAM : Membranes RE associées aux mitochondries.

Mcl-L : Protéine Mcl-1 induite par la différenciation des cellules de la leucémie myéloïde.

mFas : Fas membranaire.

mFasL : Fas Ligand membranaire.

MOMP : Perméabilisation de la membrane externe mitochondriale.

N

NCBI : Centre national d'information sur la biotechnologie.

NF- κ B : Facteur nucléaire kappa B.

NIH : Institut national de santé.

NK : Cellule tueuse naturelle.

Noxa : Protéine 1 induite par le Phorbol-12-myristate-13-acétate.

P

pb : Paire de base.

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne.

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase.

Puma : Composant 3 de liaison à bcl2.

p53 : Protéine 53.

R

RT-PCR : Rétrotranscriptase PCR.

ROS : Espèces réactives de l'oxygène (ROS).

S

sFas : Fas soluble.

sFas : Fas Ligand soluble.

shRNA : Petit ARN en épingle à cheveux.

siRNA : Petits ARN interférents.

Smac : Seconde activateur dérivé des mitochondries de la caspase.

T

T : Thymine.

t-Bid : Bid tronquée.

TCR : Récepteur des cellules T.

T_m : Température de fusion.

TM : Domaine transmembranaire.

TNF : Facteur de nécrose tumorale.

TNF-R : Récepteur du facteur de nécrose tumorale (TNF-R).

TRADD : Domaine de la mort associé au récepteur du TNF).

TRAIL : Ligand induisant l'apoptose lié au facteur de nécrose tumorale.

TRAILR : Récepteur de TRAIL.

Introduction

Scientifiquement, la prolifération cellulaire et la mort cellulaire sont des processus essentiels d'un cycle naturel de tous les organismes multicellulaires et qui sont orchestrés par un programme génétique. Historiquement, le terme de mort cellulaire programmée a été mentionné en 1965 par Lockshin et Williams. Plus tard, Kerr, Wyllie et Currie ont proposé le terme « apoptose » afin de décrire une série de caractéristiques morphologiques très particulières après la mort d'une variété des tissus. Au même moment, Horvitz et ses collaborateurs ont commencé une recherche systématique de gènes contrôlant la mort cellulaire programmée chez les vers nématodes « *Caenorhabditis elegans* » (Rezaei, 2015).

L'apoptose est une forme de mort cellulaire programmée et un processus physiologique d'élimination des cellules endommagées, dangereuses et inutiles pour maintenir l'homéostasie tissulaire.

Elle peut être induite par deux voies principales : la voie intrinsèque, qui est initiée par absence des facteurs de croissance, stress génotoxique, irradiation... Cela conduit à la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP) libérant de nombreux facteurs apoptogènes entraînant l'initiation de la cascade de cystéines protéases, de caspases pour aboutir à l'apoptose et la voie extrinsèques, qui est déclenchée par l'engagement des récepteurs de la mort (DR) tels que le récepteur Fas (fragment inducteur d'apoptose) (Seyrek and Lavrik, 2019).

Les cellules apoptotiques sont rapidement phagocytées par les phagocytes pour empêcher la libération de composants intracellulaires. Ce processus est ainsi appelé mort cellulaire propre car il empêche la libération de cytokines inflammatoires (Nagata, 2018).

Le récepteur Fas, également appelé antigène d'apoptose 1 (APO-1) ou cluster de différenciation 95 (CD95) est une protéine membranaire appartenant à la super-famille des récepteurs du facteur de nécrose tumorale (TNF).

Il est exprimé à la surface de diverses cellules, ce qui déclenche la voie apoptotique extrinsèque lorsqu'il est lié à son ligand (FasL) (Yan et al., 2019). L'interaction Fas/FasL déclenche l'activation d'une cascade d'activation qui commence par le recrutement de la protéine adaptatrice appelée domaine de la mort associé au Fas (FADD) et la pro-caspase 8 ou 10 formants le complexe de signalisation inducteur de la mort (DISC) pour activer la caspase-8 ou -10. La caspase résultante active à son tour les caspase effectrices (-3, -6, -7) pour déclencher l'apoptose (Qadir et al., 2020).

Introduction

Fas joue un rôle complexe dans l'immunité anti-tumorale et l'apoptose médié par Fas contribue aux processus cellulaires physiologiques et pathologiques. Dans le microenvironnement tumorale, l'activation de FasL exprimé à la surface des cellules immunitaires notamment, les cellules tueuses naturelles (NK) et les lymphocytes T cytotoxiques activés (LTCs) entraîne l'interaction entre le FasL et son récepteur Fas exprimé sur les cellules tumorales pour déclencher une cascade de signalisation aboutissant à l'apoptose de ces cellules.

De plus, le fait de ne pas réguler efficacement le processus d'apoptose peut avoir des conséquences désastreuses et conduire à la progression tumorale.

Le gène *Fas* qui code pour le récepteur Fas est situé sur le bras long du chromosome humain 10 en position 23,31. Il comprend 16 introns et 15 exons (d'après NCBI).

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une technique établie pour amplifier et détecter des séquences nucléotidiques d'intérêts à partir d'une ou de quelques molécules cibles (Sidstedt et *al.*, 2020 ; Fujita et *al.*, 2018). Une PCR peut être réalisée à l'aide d'amorces correspondant à la séquence spécifique dans le fragment d'ADN inséré (Sakurai et *al.*, 2019).

La PCR est largement appliqué dans le diagnostic rapide des maladies infectieuses comme le cas le plus récent de COVID-19, la sécurité sanitaire des aliments et de l'eau, la médecine légale, les polymorphismes à l'échelle de la population et les études de mutation (Chan et *al.*, 2016).

L'objectif de cette thèse est de concevoir soigneusement des amorces permettant d'encadrer la séquence à amplifier du gène *Fas* pour garantir la reproductibilité et l'efficacité de la PCR.

Chapitre 1

Revue de la littérature

1.1 Processus de l'apoptose	4
1.2 Fas	11
1.3 Fas et processus apoptotique dans l'immunité anti-tumorale	15
1.4 Réaction de polymérisation en chaîne	18

Chapitre 1

Revue de la littérature

1.1 Processus de l'apoptose

1.1.1 Définition

L'apoptose est une forme de mort naturelle programmée prise pour sacrifier des cellules spécifiques au profit de l'organisme, en réponse à divers stimuli de manière régulée et contrôlée (Xu et *al.*, 2019a). Ce mécanisme de mort cellulaire joue un rôle central dans le développement, l'homéostasie tissulaire et la surveillance (Redza-Dutordoir and Averill-Bates, 2016).

Le terme apoptose a été proposé pour la première fois en 1972 par Kerr et ses collaborateurs, pour décrire un type de mort cellulaire associé à des changements morphologiques dépendants des caspases (Rezaei, 2020). En 1999, la première description et compréhension du processus de l'apoptose a été tirées des études sur le développement du nématode «*Caenorhabditis elegans*» (Kiraz et *al.*, 2016).

1.1.2 Changements biologiques et morphologiques

Lors de l'apoptose, la cellule va subir plusieurs changements biologiques et morphologiques, y compris les modifications de la forme de la cellule qui va s'arrondir et sa taille se réduire. À l'intérieure de la cellule, le noyau va se rétrécit (pycnose), ce qui provoque la condensation et la fragmentation de la chromatine (caryolyse). Puis, la membrane plasmique de la cellule va bourgeonner et former des corps apoptotiques (ApoBD) contenant les débris cellulaires (organelles et fragments nucléaires), qui sont rapidement phagocytés par les phagocytes en évitant une réponse inflammatoire (Nowak and Edelstein, 2019 ; Xu et *al.*, 2019b) (figure 1.1).

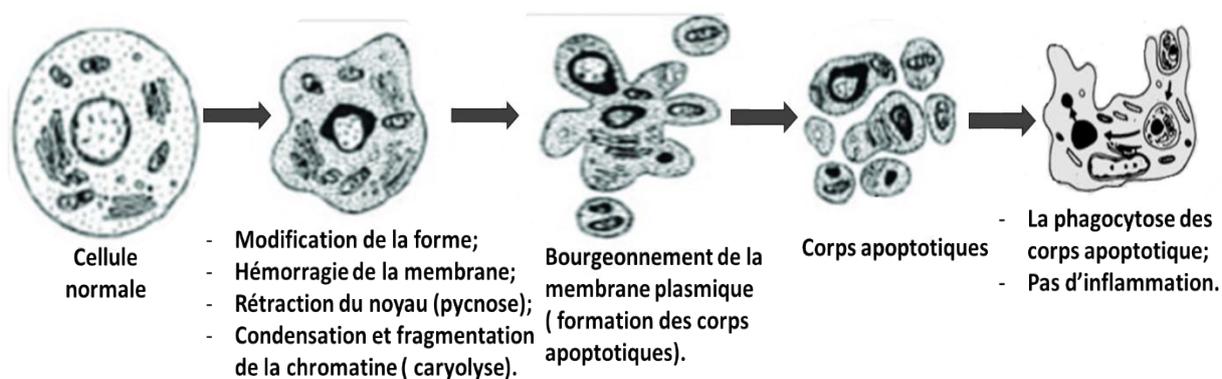


Figure 1.1. Les changements morphologiques de la cellule apoptotique (Van Cruchten and Van den Broeck, 2002). La cellule apoptotique est de petite taille avec une chromatine condensée et fragmenter, ses fragments vont se séparer en corps apoptotiques avec sécrétion des chimiokines pour attirer les phagocytes sans déclenchement d'une réaction inflammatoire.

1.1.3 Les voies d'induction de l'apoptose

Le processus de l'apoptose est une sécurité intégrée et se produit par l'imbrication étroite de nombreux gènes et des voies de signalisation régulant la prolifération, la croissance et la survie (Ucker and Levine, 2018).

Elle peut être déclenchée par la cellule elle-même par deux voies de signalisation distinguées par l'origine des signaux distincts, la voie extrinsèque ou la voie du récepteur de la mort, qui est activée par l'interaction des ligands apoptotiques avec leurs récepteurs de mort (DR) exprimés à la surface de nombreuses cellules (Mehrbod et al., 2019) et la voie intrinsèque ou la voie mitochondriale, qui est activée par l'accumulation de dommages à ADN, stress génotoxique, la dérégulation des fonctions mitochondriales, l'irradiation et des infections virales. Ces deux voies convergent et appliquent l'activation des caspases qui orchestrent les stades finaux de l'apoptose (Legembre, 2017).

1.1.3.1 La voie extrinsèque

La voie apoptotique extrinsèque est déclenchée par l'interaction des ligands de la mort de la famille des protéines du facteur de nécrose tumorale (TNF) exprimés à la surface d'une cellule immunitaire (cellule tueuse naturelle (NK) ou lymphocyte T cytotoxique (LTC)) avec leurs récepteurs correspondants issus de la super-famille des récepteurs TNF (TNF-R), exprimés à la surface d'une cellule cible (tableau 1.1) (D'Arcy, 2019). La fixation du ligand de

Chapitre 1. Revue de la littérature

mort sur son récepteur DR induit une oligomérisation et un changement de conformation du récepteur conduisant à son activation (Gallucci et *al.*, 2020).

Le récepteur activé recrute une protéine adaptatrice connue sous le nom de domaine de la mort associé au Fragment inducteur d'apoptose Fas (FADD) ou domaine de la mort associé au récepteur du TNF (TRADD), par le biais de son domaine de mort DD, qui va fixer à son tour les pro-caspases initiateuses (pro-caspase 8 ou 10) par un domaine appelé domaine effecteur de mort (DED), entraînant la formation du complexe de signalisation inducteur de mort (DISC). Ce complexe favorise la dimérisation et l'auto-activation des pro-caspase 8 ou 10. La caspase résultante pouvant entraîner l'apoptose (Kakarla et *al.*, 2020) (figure 1.2).

Tableau 1.1. Récepteurs de la mort et leurs ligands correspondants (D'Arcy, 2019).

Récepteur de la mort (DR)	Ligand de la mort
TNFR1 (Récepteur du facteur de nécrose tumorale) ou DR1 (Récepteur de la mort 1)	TNF α
Fas (Fragment inducteur d'apoptose), cluster de différenciation 95 (CD95) ou Apo-1 (Antigène apoptotique 1)	FasL ou CD95L
TRAMP ou DR3	TL1A
TRAIL-R1 (Récepteur de ligand induisant l'apoptose lié au facteur de nécrose tumorale) ou DR4	TRAIL ou Apo-2L
TRAIL-R2 ou DR5	TRAIL

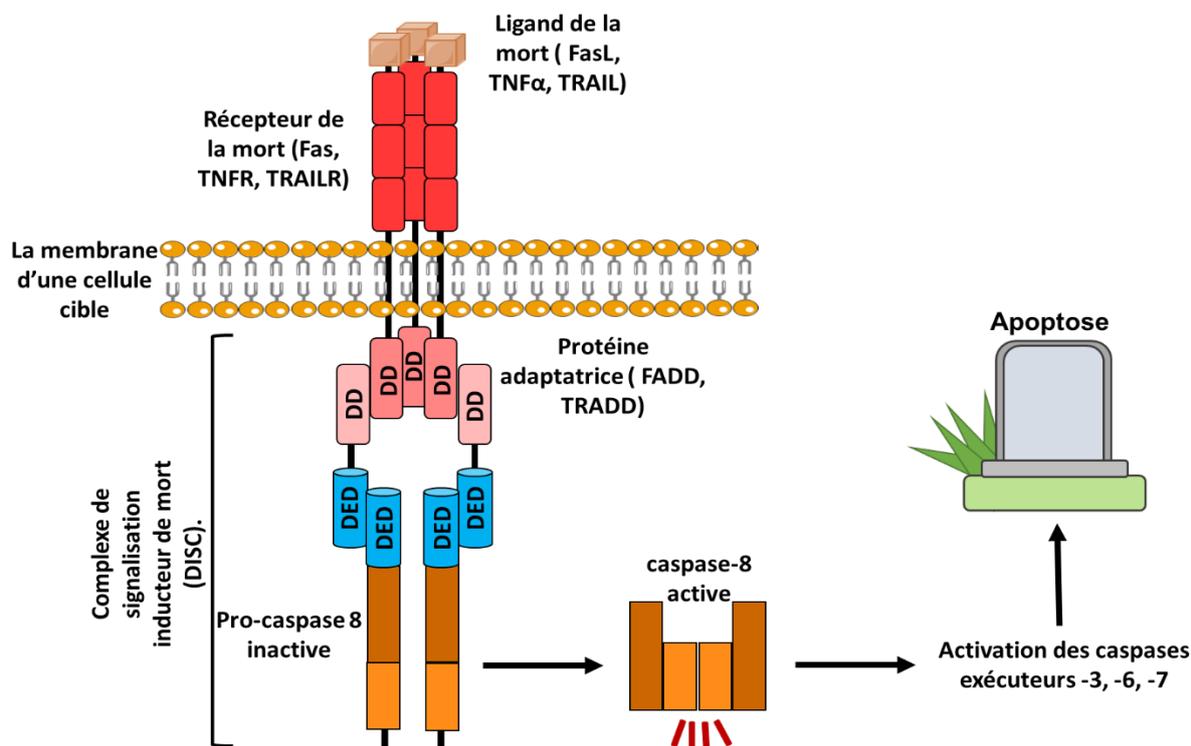


Figure 1.2. La voie apoptotique extrinsèque induite par la super-famille des récepteurs du TNF (d'après researchgate). La voie extrinsèque est initiée par la liaison des récepteurs de la mort exprimés à la surface cellulaire avec leurs ligands. A la suite de cette liaison, les récepteurs vont recruter les protéines adaptatrices et les pro-caspases initiatrices (8, 10) via leur domaine DD formant le complexe DISC responsable de l'activation de ces caspases, qui vont ensuite à leur tour activer les caspases effectrices (-3, -6, -7) et provoquer la mort cellulaire par apoptose.

1.1.3.2 La voie intrinsèque

La voie apoptotique intrinsèque est favorisée par de nombreux stimuli, y compris les dommages à ADN, le stress du réticulum endoplasmique (ER), la surcharge des espèces réactives de l'oxygène (ROS), le stress de réplication (Galluzzi et al., 2018).

Ces stimuli intracellulaires provoquant une perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP), entraînant la libération d'une série de facteurs apoptogènes dans le cytosol. Ces facteurs comprennent le cytochrome c, deuxième activateur dérivé des mitochondries de la caspase (Smac)/protéine de liaison directe à la protéine inhibitrice d'apoptose IAP avec un faible PI (DIABLO), High-temperature requirement (HtrA2/Omi), facteur inducteur de l'apoptose (AIF) et l'endonucléase G (endo G) (Redza-Dutordoir and Averill-Bates, 2016).

Une fois que Le cytochrome c est dans le cytosol, il s'associe au dATP et se lie à une protéine cytoplasmique facteur 1 d'activation de la protéase apoptotique (Apaf-1) conduisant

Chapitre 1. Revue de la littérature

au recrutement de la pro-caspase 9, ce complexe formé est appelé apoptosome, qui permet l'activation de la pro-caspase 9. La caspase-9 activée, active ensuite la pro-caspase 3 pour former la caspase-3, qui clive à son tour plus de 500 substrats cellulaires dans les voies extrinsèque et intrinsèque à la fois pour déclencher l'apoptose (Nagata and Tanaka, 2017).

D'autre part, les facteurs, Smac/DIABLO et HtrA2/Omi favorisent l'activation de la caspase en antagonisant les protéines inhibitrices d'apoptose (IAPs) (figure 1.3). L'autre groupe de facteurs, principalement l'AIF et l'endo G agissent directement dans le noyau pour favoriser la fragmentation de l'ADN et la condensation nucléaire provoquant l'apoptose d'une manière indépendante de la caspase (Tower, 2015).

En tant qu'événement important de la voie intrinsèque d'apoptose, la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale est particulièrement régulée par la famille de lymphome 2 à cellules B (Bcl-2). Les protéines appartenant à cette famille peuvent être divisés en trois groupes selon la fonction de leur action pro- ou anti-apoptotique ou des domaines d'homologie Bcl-2 (BH) qu'elles possèdent (tableau 1.2) :

- Les protéines pro-apoptotiques protéine x associée à bcl-2 (Bax) responsable de la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et de l'apoptose.
- Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, qui peuvent inhiber l'activation de la caspase en empêchant l'activation de Bax/Antagoniste/tueur homologue Bcl-2 (Bak).
- Les protéines pro-apoptotiques BH3 seul, qui interagissent avec des protéines anti-apoptotiques pour empêcher leur fonction et/ou pour interagir directement avec des protéines pro-apoptotiques pour provoquer leur activité (Trejo-Solís et al., 2018 ; Ke et al., 2016).

Tableau 1.2. Les protéines de la famille Bcl-2 (Kakarla et al., 2020).

Protéines Pro-apoptotiques	Protéines Anti-apoptotiques	Protéines pro-apoptotiques BH3 uniquement
Bax	Bcl-2	Bim
Bak	Bcl-XL	Bid
Bok	Bcl-w	Bik
	Mcl-L	Bad
	A1	Bmf
		Hrk
		Noxa
		Puma

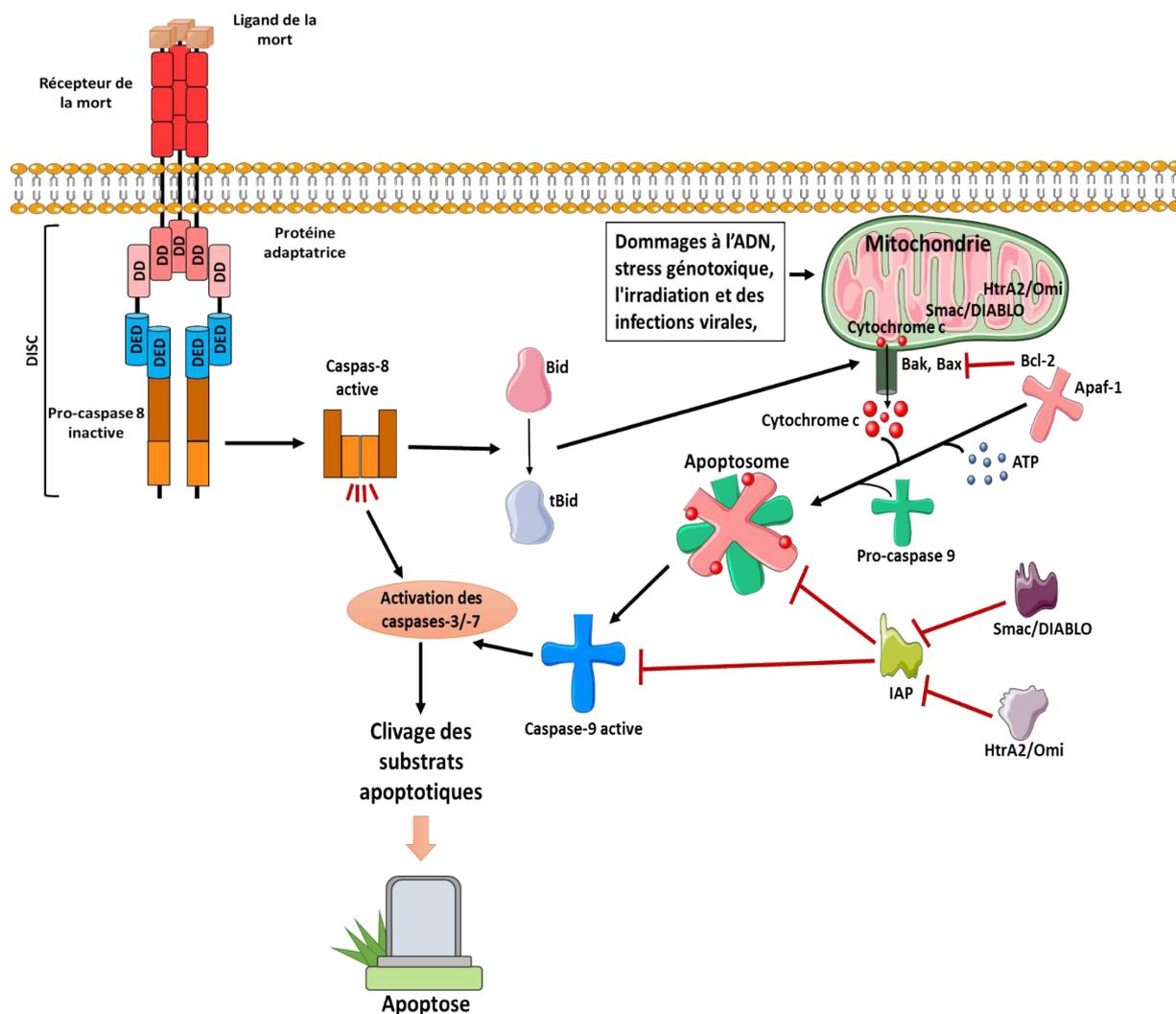


Figure 1.3. La voie apoptotique intrinsèque (Lamkanfi and Dixit, 2010). La voie intrinsèque est déclenchée par divers stimuli (dommages à ADN, stress génotoxique, l'irradiation...) qui vont provoquer la perméabilisation des membranes externes mitochondriales. Cette perméabilisation peut s'expliquer par la formation de pores à travers les membranes via l'oligomérisation des protéines Bax et Bak permettant de libérer plusieurs facteurs pro-apoptotiques tel que le cytochrome c, Smac/DIABLO ou HtrA2/Omi de mitochondrie vers le cytosol. Le cytochrome c forme l'apoptosome avec Apaf-1 et la pro-caspase 9 qui aura pour but d'activer la caspase-9 qui activera à son tour les caspases effectrices. Les facteurs Smac/DIABLO et HtrA2/Omi vont quant à eux inhiber les IAPs. D'autre part, la voie extrinsèque est liée à la voie intrinsèque car l'activation des caspases initiateuses 8 et 10 va provoquer le clivage de Bid en tBid actif favorisant ainsi la translocation de Bax à la membrane mitochondriale et l'activation de la voie intrinsèque. Les flèches rouges tronquées signifient l'inhibition.

1.1.4 Régulation de l'induction de l'apoptose

La régulation de l'apoptose implique différents mécanismes. Premièrement, l'activation des caspases par des calpaïnes ou leur inactivation par les membres de la famille des IAPs possédant des domaines BIR impliqués dans l'interaction de ces membres avec les caspases pour inhiber leur activité catalytique et par les protéines inhibitrices de FLICE (FLIPs) qui

interagissent avec les molécules adaptatrices recrutées par les récepteurs de mort empêchant l'activation des caspases. Deuxièmement, les protéines de la famille BCL-2, qui comprend les protéines anti-apoptotiques responsables de l'inhibition de l'apoptose par la prévention de la perméabilisation mitochondriale en séquestrant les protéines pro-apoptotiques qui sont responsables de l'induction de l'apoptose par les protéines BH3 seul qui vont s'activer suite à un signal apoptotique puis activer à leur tour les protéines pro-apoptotiques ou inhiber les protéines anti-apoptotiques. Troisièmement, l'échanges calciques par l'implication des membranes ER associées aux mitochondries (MAMs), qui sont des zones où les réticulums endoplasmiques et les mitochondries sont étroitement accolés en contact facilitant ainsi le transfert de Ca^{2+} nécessaire au bon fonctionnement de nombreuses réactions métaboliques (DUPLAQUET, 2018) (figure 1.4).

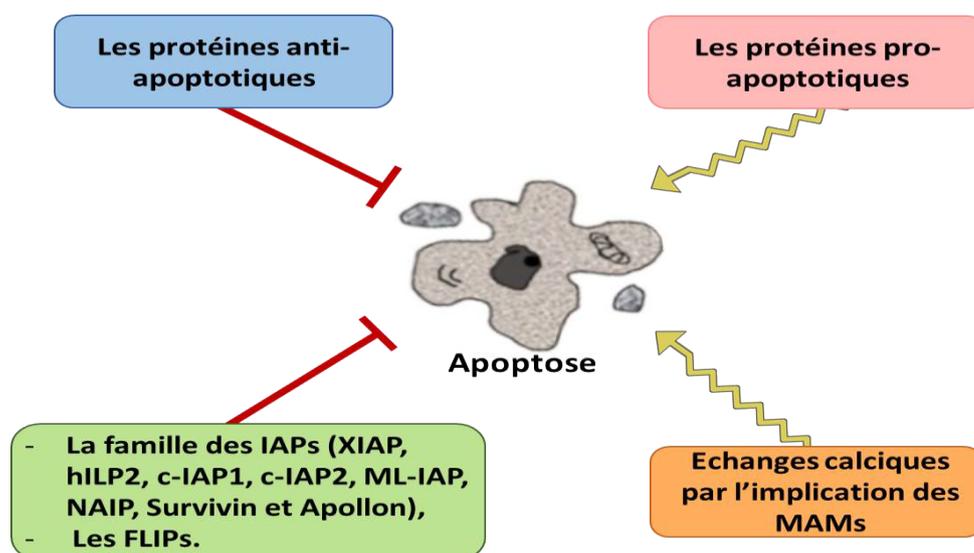


Figure 1.4. Les mécanismes impliqués dans la régulation de la voie apoptotique (Trejo-Solís et *al.*, 2018). La régulation de l'apoptose est assurée par un ensemble des protéines (protéines pro-apoptotiques, protéines anti-apoptotiques, les IAPs...) participant au développement normal d'un organisme ainsi qu'au maintien de l'homéostasie. Les flèches rouges tronquées signifient l'inhibition et les flèches vertes signifient l'activation.

1.1.5 Altération de l'apoptose

L'apoptose est un processus essentiel à la vie. L'altération de ce processus ou de son contrôle, contribue à une mort cellulaire excessive par les dommages des principales cellules fonctionnelles saines, tels qu'un accident vasculaire cérébral ou une réaction de rejet d'allogreffe ou contribue à une mort cellulaire insuffisante. Cette altération est à l'origine de développement de plusieurs pathologies comme les maladies auto-immunes, les maladies

neurodégénératives, y compris les maladies d'Alzheimer, ainsi que les infections ou encore le cancer (Arnott and Sonia Lobo, 2020) ; Wang and Zhang, 2019).

Il existe de nombreuses façons par lesquelles les voies apoptotiques extrinsèque et intrinsèque peuvent être altérées. Ils comprennent : une fonction altérée de système protéine 53 (p53), une fonction réduite des caspases, les mutations du gène Fas, une expression aberrante des composants cytosoliques de la voie apoptotique médiée par Fas, une surexpression de la protéine anti-apoptotique c-Flip, recrutée au niveau du DISC, qui empêche l'auto-activation de la pro-caspase 8, une régulation négative d'une ou plusieurs protéines pro-apoptotiques, une expression réduite du composant de base de l'apoptosome, Apaf-1 et un niveau élevé d'expression des IAPs (figure 1.5) (Pistritto et al., 2016).

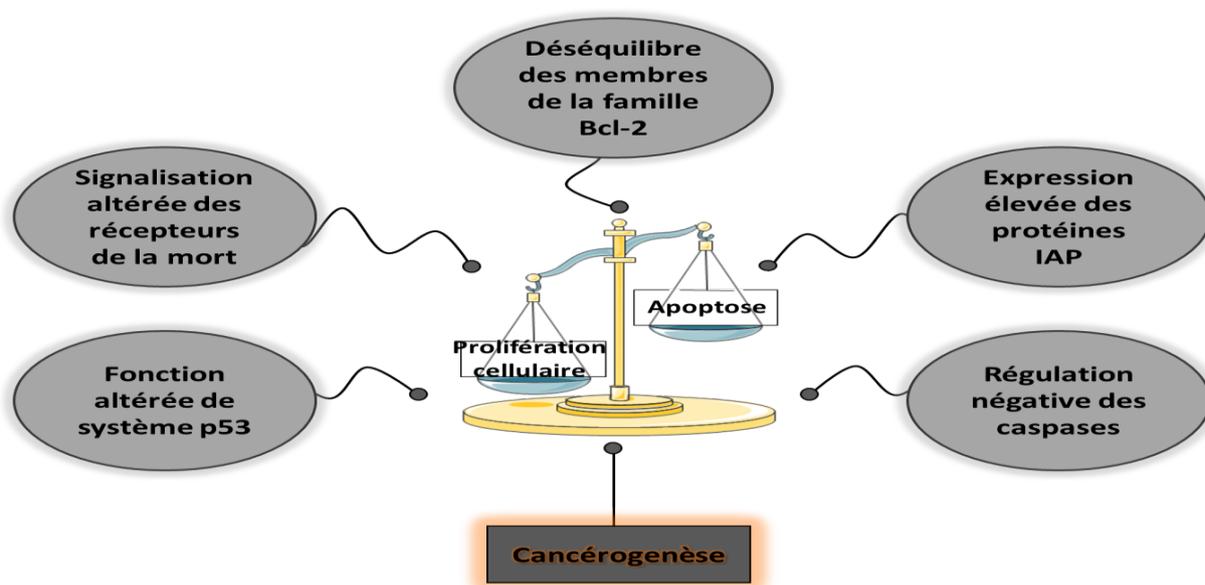


Figure 1.5. Les facteurs responsables de la dérégulation de l'apoptose (Pistritto et al., 2016). Différentes façons par lesquelles les deux voies de l'apoptose peuvent être modifiées, entraînant une mort cellulaire excessive ou une mort insuffisante responsable au développement de plusieurs pathologies telles que la progression tumorale.

1.2 Fas

1.2.1 Gène Fas

Le gène *Fas* occupe environ 25 kb sur le chromosome 10 chez l'homme (figure 1.6). Il est composé de 16 introns et 15 exons (d'après NCBI). Le ligand Fas (FasL) est codé par le gène FasL situé sur le chromosome humain 1 (Kiraz et al., 2016).

Le gène *Fas* est hautement polymorphe, il existe une substitution A à G à la position 670 et une substitution G à A à la position 1377 dans la région du promoteur Fas chez certains individus.

Ces polymorphismes peuvent réduire l'activité du promoteur et l'expression du *Fas* (Yan et al., 2019). En outre le gène *Fas* code pour deux isoformes majeurs le Fas membranaire (mFas), qui est traduit à partir de l'ARNm pleine longueur contenant des domaines intracytoplasmique, transmembranaire et extracellulaire, et le Fas soluble (sFas) dépourvue de domaine transmembranaire résultant d'un épissage alternatif du pré-ARNm. Le mFas déclenche l'apoptose tandis que le sFas inhibe l'apoptose en se liant au Fas et au FasL (Kishore Kumar et al., 2016)

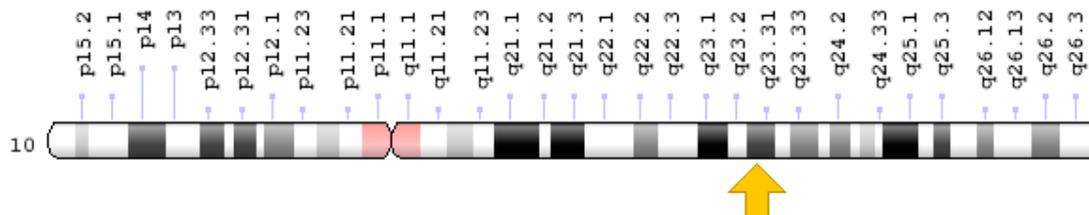


Figure 1.6. Localisation du gène Fas (d'après NIH). Le gène *Fas* est localisé sur le bras long du chromosome humain 10 en position 23,31. Ce gène code pour la protéine Fas impliquée dans la signalisation cellulaire. Trois protéines Fas se regroupent pour former un trimère, qui interagit ensuite avec son ligand pour remplir sa fonction de signalisation apoptotique.

1.2.2 Récepteur Fas

1.2.2.1 Définition/Structure

Le récepteur Fas, également appelé antigène apoptotique 1 (APO-1) ou cluster de différenciation 95 (CD95), est une protéine membranaire de type I faisant partie de la famille des récepteurs TNF (Nagata, 2018).

Ce récepteur est de 40 à 50 kDa, exprimé de manière ubiquitaire dans le corps et qui intervient dans l'apoptose lors de l'interaction avec son ligand de mort FasL (Legembre, 2017). Fas a 319 acides aminés (aa) et se compose d'un domaine intracellulaire C-terminale formant le domaine DD de 145 aa, une région transmembranaire (TM) a 17 aa et un domaine extracellulaire N-terminal a 157 aa, caractérisé par la présence de trois domaines riches en cystéine (CRD) (figure 17). Le domaine CRD2 et CRD3 interagissent avec le FasL (Seyrek and Lavrik, 2019 ; Yamada et al., 2017).

L'interaction de Fas avec FasL, qui est de nature trimérique, Fas est stimulé à former des trimères compétents pour la signalisation, résultant en l'assemblage du complexe de signalisation DISC (Fu et al., 2016).

La majorité du récepteur Fas se localise dans le cytosol, particulièrement, dans le complexe de Golgi et après un stimulus pro-apoptotique, son expression augmente sur la membrane

plasmique initiant le signal apoptotique. Ce mécanisme évite l'activation spontanée de Fas et donc évite une activation inutile de la voie apoptotique (Nada, 2016).

1.2.3 Ligand Fas

1.2.3.1 Définition/Structure

Le ligand Fas (également connu sous le nom de CD95L, FasL ou CD178) est une glycoprotéine transmembranaire appartenant aux cytokines de la superfamille de TNF de type 2, qui active les voies de signalisation apoptotiques ou non apoptotiques lorsqu'il est lié à son récepteur Fas. Il est exprimé à la surface des cellules NK et des LTCs activés pour induire l'apoptose des cellules cancéreuses et des cellules infectées par un virus et il est existé sous deux formes, une forme membranaire (mFasL) et une forme soluble (sFasL) (Stephan et al., 2017). FasL contient un domaine extracellulaire, qui est responsable de la reconnaissance du récepteur Fas et du CDR3, et de l'auto-association du ligand, une région transmembranaire, qui est moins étudiée et un domaine intracellulaire responsable de l'ancrage de cette protéine à la membrane plasmique (Glukhova et al., 2018) (figure 1.7).

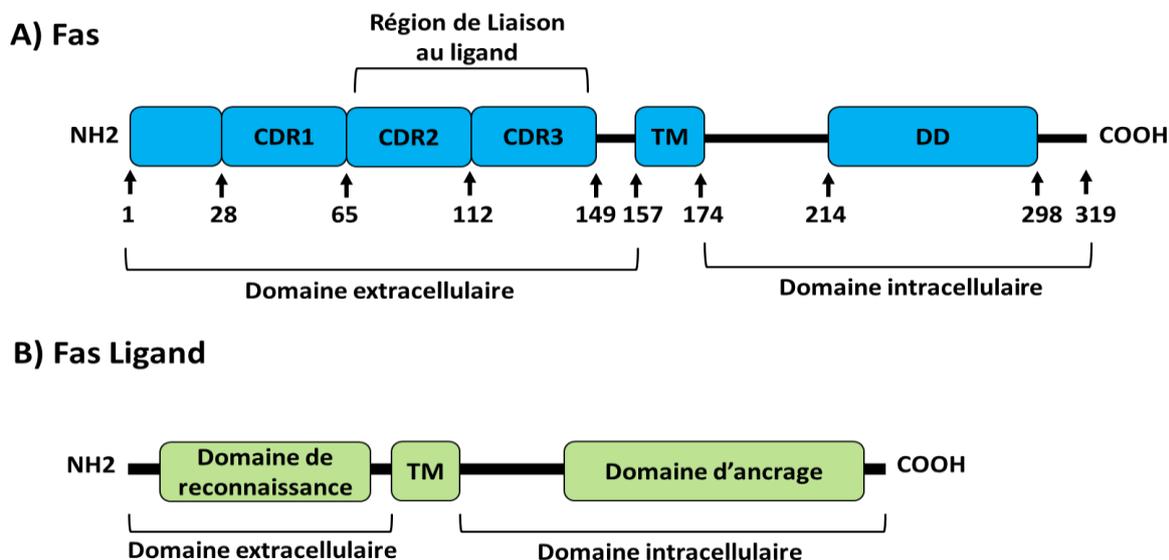


Figure 1.7. La structure du récepteur Fas et son ligand FasL (file:///C:/Users/TM161/Downloads/fas%20receptor/42-Figure9-1.png). A). Le récepteur Fas est formé d'un domaine extracellulaire responsable de la liaison au ligand, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire contenant le domaine DD responsable de la signalisation apoptotique. B). Le ligand Fas est composé d'un domaine extracellulaire responsable de la reconnaissance du récepteur, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire responsable de l'ancrage à la membrane.

1.2.4 Apoptose médiée par l'interaction Fas/FasL

Lors de la liaison de Fas avec son ligand FasL, le récepteur change sa conformation et active le complexe DISC, qui est un régulateur central de la voie de signalisation Fas induisant à la fois des voies apoptotiques et des voies non apoptotiques comme phosphoinositide 3-kinase (PI3K), kinase régulée par des signaux extracellulaires (ERK) et facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) (Le Gallo and Legembre, 2017).

L'une des nombreuses activités non apoptotiques rapportées de Fas est de conduire et de maintenir les cellules souches cancéreuses (CSC) (Qadir et al., 2020). Le complexe de DISC se compose de la protéine adaptatrice FADD, qui interagit via son domaine DD avec un DD analogue appartenant au Fas activé recrutant et activant les caspases pro-apoptotiques 8 ou 10 et une pseudo-caspase, à savoir cFLIP.

La caspase-8 ou -10 activée clive puis active la caspase-3, -6 et -7, qui ciblent les substrats cellulaires exécutant finalement l'apoptose (Chang et al., 2016). La caspase-8 ou -10 activée entraîne par la suite l'apoptose soit directement par l'activation des caspases effectrices -3, -6 ou -7 (appelée cellules de type I, par exemple, les thymocytes) soit indirectement par l'engagement de la voie intrinsèque à médiation mitochondriale (appelée cellules de type II, les hépatocytes et les fibroblastes).

Dans les cellules de type II, la caspase-8 ou -10 cible et clive la protéine BH3 seul, agoniste de la mort du domaine d'interaction BH3 (Bid) pour générer une Bid tronquée (t-Bid), qui migre vers les mitochondries où elle active les protéines de la famille de Bcl-2 pour induire la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale, de sorte que cette coopération en prise avec la voie intrinsèque (O' Reilly et al., 2016) (figure 1.8).

Le système Fas /FasL joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie lymphocytaire, l'élimination des cellules infectées, la surveillance cellulaire et la protection de l'organisme contre l'auto-immunité et le développement tumoral (Fu et al., 2016).

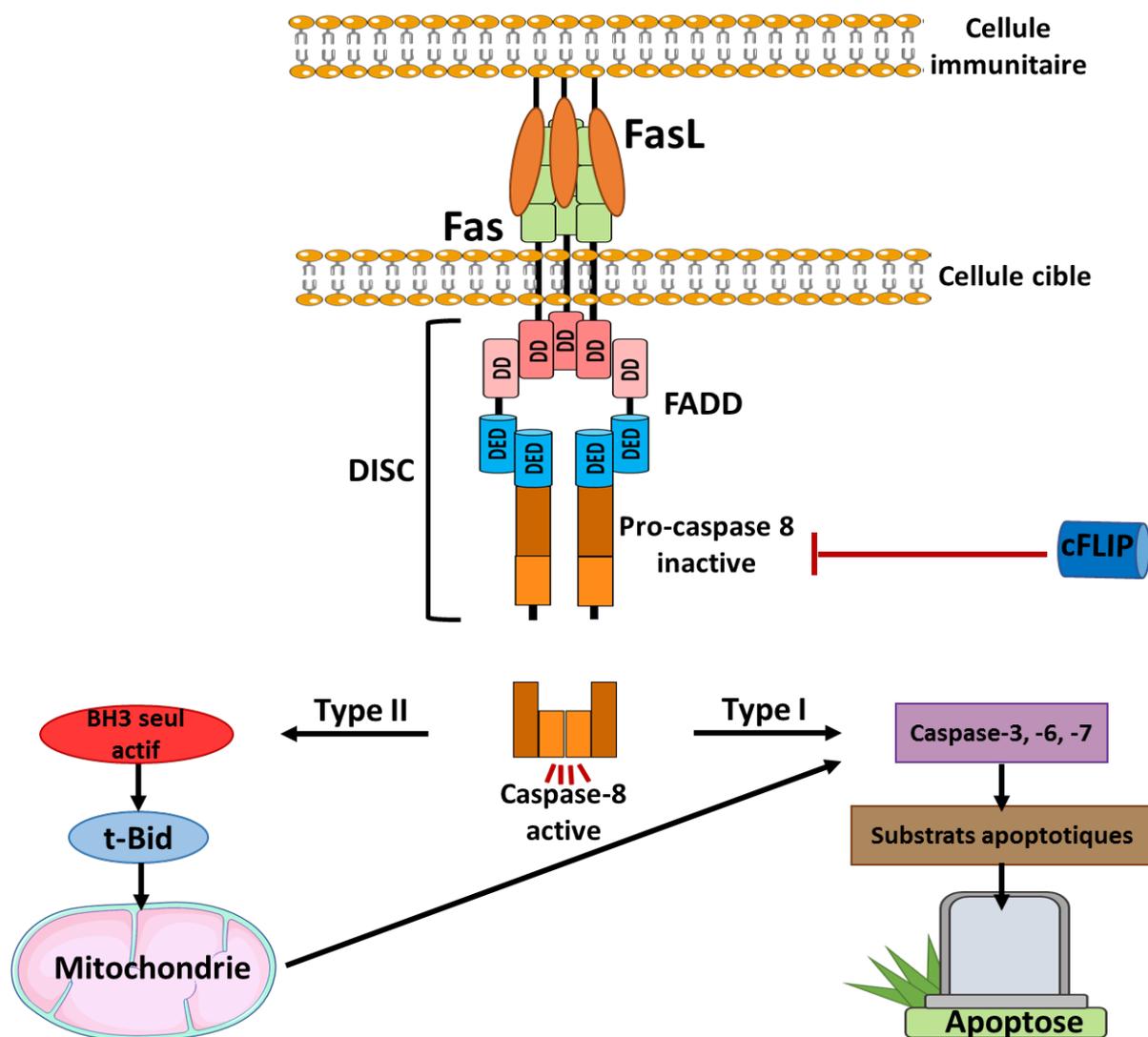


Figure 1.8. La voie de signalisation induite par l'interaction Fas/FasL (Yamada et al., 2017). La liaison de Fas avec FasL favorise le recrutement de la protéine FADD et la pro-caspase 8/10 formant le complexe DISC qui active la caspase-8/10. Dans le type I, la caspase-8/10 activé, active directement les caspases effectrices qui déclenchent l'apoptose. Dans le type II, la capase-8/-10 clive Bid en t-Bid, qui migre vers les mitochondries où elle active des protéines de la famille de Bcl-2 (Bak, Bax) pour induire la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale, de sorte que cette coopération en prise avec la voie intrinsèque.

1.3 Fas et processus apoptotique dans l'immunité anti-tumorale

L'élimination des cellules cancéreuses est l'un des rôles importants du système immunitaire. Les deux principaux acteurs anti-tumorales sont les cellules NK et les LTCs. Parmi les mécanismes utilisés par ces cellules pour tuer leur cible est l'expression des ligands de la mort FasL.

Le FasL est un deuxième moyen utilisé par les lymphocytes pour tuer le cancer. Il pourrait être utilisé de manière prééminente lorsqu'une quantité limitée d'ag est présentée par les cellules tumorales. Cette hypothèse est cohérente avec les études antérieures montrant qu'une faible signalisation TCR est capable d'activer un FasL (Rossin et *al.*, 2019a).

En réponse aux antigènes tumoraux et aux cytokines sécrétées par certaines populations de cellules NK et les cellules auxiliaires Th1 dans le microenvironnement tumoral, les cellules NK et les LTCs induisent les ligands de la mort FasL pour s'associer avec leur récepteurs Fas présents sur les cellules tumorales, entraînant la mort cellulaire apoptotique de ces dernières (O' Reilly et *al.*, 2016) (figure 1.9).

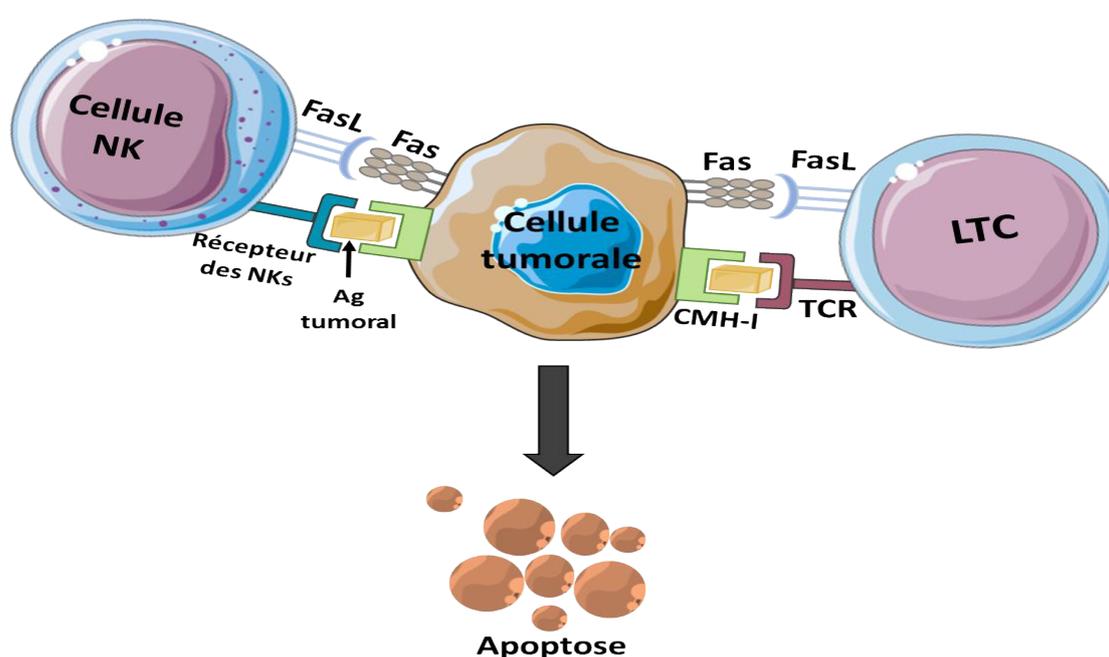


Figure 1.9. Élimination des cellules cancéreuses par l'interaction Fas/FasL (Abbas et *al.*, 2012). En réponse aux antigènes tumoraux, les cellules NK et les LTCs vont s'activer via leurs récepteurs reconnaissant ces antigènes et vont exprimer le FasL qui s'interagit avec son récepteur Fas exprimé à la surface de la cellule tumorale. Cette interaction entraîne la mort de la cellule tumorale par apoptose.

L'apoptose est le processus le plus largement étudié et le plus caractérisé. Elle a acquis une grande renommée en tant que mécanisme anticancéreux. Il est connu que dans le cancer la cellule ne parvient pas à déclencher l'apoptose en raison de mutations dans les différentes voies d'initiation de l'apoptose.

Si la cellule ne répond pas aux signaux externes, ce qui provoquerait normalement la voie extrinsèque ou inhiberait la prolifération, cela provoque la croissance incontrôlée de la cellule, entraînant la progression d'une tumeur. Étant donné que la résistance à l'apoptose est

essentiellement acquise dans le développement du cancer, les thérapies anticancéreuses actuelles sont basées sur le déclenchement de l'apoptose dans les cellules cancéreuses (Gregory, 2016).

L'altération de la voie apoptotique extrinsèque est associée à un dysfonctionnement du système Fas/FasL ou l'expression anormale des composants cytosoliques de cette voie apoptotique contribuant à la résistance des cellules tumorales à l'apoptose médiée par Fas et favorisant la progression tumorale (Pistritto et al., 2016) (figure 1.10).

Physiologiquement, le système Fas/FasL ont une activité antitumorale. Cependant, il joue également un rôle crucial dans la progression tumorale (Sharma et al., 2019) par l'induction des voies non apoptotiques, en particulier NF- κ B menant à la prolifération plutôt qu'à l'apoptose. Cependant, les détails des voies non apoptotiques médiées par Fas restent inconnus (Nada, 2016)

En effet, Fas ne fonctionne pas seulement comme DR et que l'inhiber plutôt que de l'activer peut-être une option thérapeutique plus attrayante pour les patients souffrant de cancers. Ils ont récemment observé que sFasL est surexprimé dans le sérum de patients cancéreux favorisant la cancérogenèse via l'activation de voies de signalisation non apoptotiques (Le Gallo et al., 2017).

De plus, il a été démontré à plusieurs reprises que l'expression de FasL par des cellules tumorales résistantes à l'apoptose pourraient contre-attaquer le système immunitaire en induisant l'apoptose des cellules immunitaires antitumorales (Rossin et al., 2019b) (figure 1.10).

Récemment, ils ont testé la pertinence de ces fonctions non apoptotiques de Fas et FasL pour les cellules cancéreuses par l'élimination de Fas ou de FasL dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses en utilisant plusieurs petits ARN interférents (siRNA) et petit ARN en épingle à cheveux (shRNA). Cette élimination tue les cellules cancéreuses dans un processus appelé mort induite par l'élimination de Fas/FasL (DICE).

Ils ont postulé que le DICE est un mécanisme de défense antitumorale naturel qui empêche la survie des cellules cancéreuses qui sont dépourvues de Fas. De plus, des données récentes suggèrent que les cellules cancéreuses ne peuvent jamais perdre Fas ou FasL et si elles le font, elles meurent, ce qui offre la possibilité d'utiliser le ciblage des ARNm de Fas et de FasL pour ne pas exercer leur activité pour protéger les cellules cancéreuses du DICE de l'intérieur de la cellule et donc traiter le cancer (Peter et al., 2015).

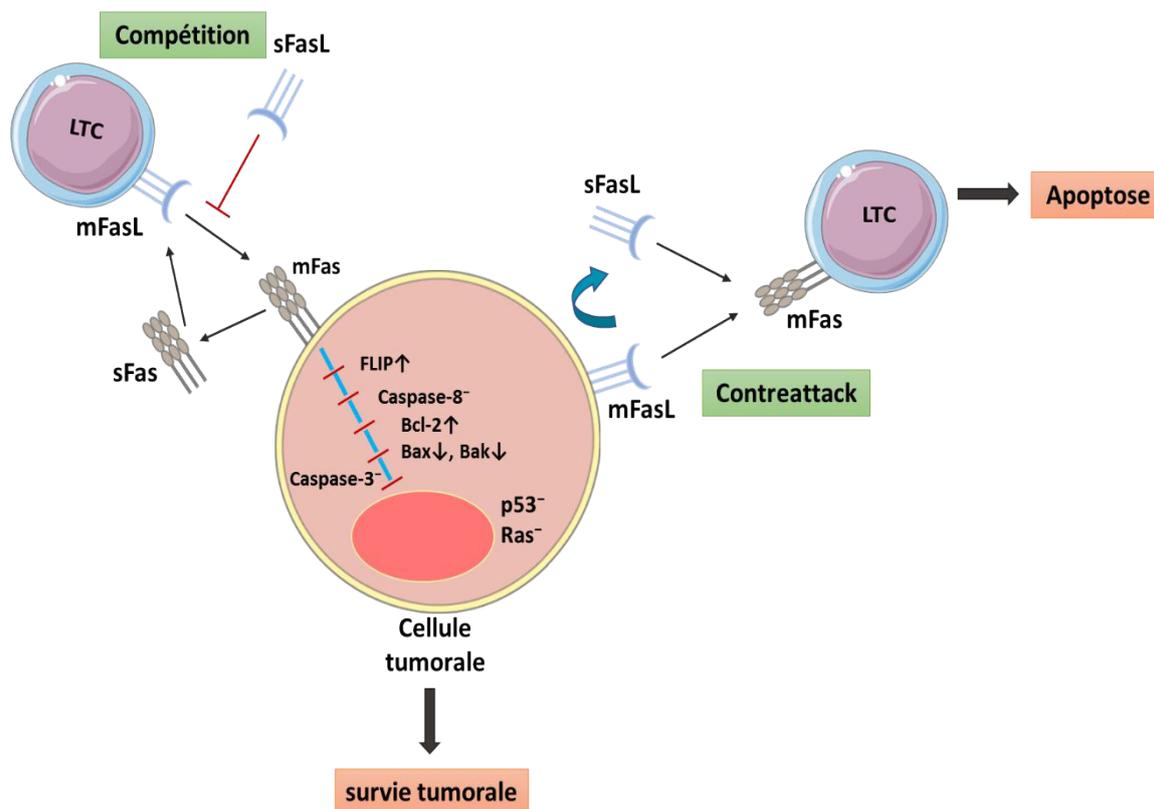


Figure 1.10. La résistance de la cellule tumorale à l'apoptose (Kim et al., 2006). La cellule tumorale peut devenir résistante à l'apoptose par différentes façons, y compris l'inhibition de l'interaction entre le mFasL et le mFas lorsque le sFasL entre en compétition avec le mFasL pour se lier au mFas, la cellule tumorale peut contrattaquer la cellule immunitaire par l'expression de mFasL au lieu de mFas entraînant l'apoptose de la cellule immunitaire et l'altération des protéines intervenant dans la signalisation et la régulation de l'apoptose.

1.4 Réaction de polymérisation en chaîne

La technique de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est connue comme l'une des inventions les plus largement utilisées dans la recherche médicale et biologique. Développée par Kary Mullis en 1983, pour amplifier une séquence d'ADN cible *in vitro*, générant des milliers à des millions de copies de cette séquence (Wu and Wu, 2019). Il a un large éventail d'applications dans le clonage d'ADN pour le séquençage, l'analyse fonctionnelle des gènes, l'identification des empreintes génétiques et le diagnostic des maladies héréditaires et infectieuses (Wang et al., 2017).

1.4.1 Principe

Le principe de la technique de PCR est de permettre une amplification enzymatique *in vitro* d'une séquence connue d'ADN par la synthèse des amorces complémentaires à cette

séquence, délimitant la région que l'on veut amplifier et initiant la synthèse de brin complémentaire à l'aide de l'ADN polymérase (Touati, 2013).

1.4.2 Les acteurs

La technique de la PCR nécessite la présence des acteurs suivants (figure 1.11) (Zhong et al., 2016) ; Maheaswari et al., 2016) :

- L'ADN matrice : est une séquence d'intérêt connue de 100 à 1000 paires de bases (pb) qui doit être amplifiée ;
- Deux amorces (sens et anti-sens) pour initier la synthèse d'ADN : sont des séquences d'acide nucléique simple brin (appelées oligonucléotides) de 16 à 20 bases capables de s'hybrider spécifiquement à l'ADN cible.
- L'ADN polymérase thermostable pour catalyser la synthèse d'ADN : est une enzyme thermorésistante appelée taq polymérase extraite de la bactérie *Thermus aquaticus* qui relie les nucléotides libres ensemble pour former le produit de PCR.
- Les Nucléotides (dNTPs) : dGTP, dATP, dTTP, dCTP appelés désoxynucléotides triphosphates qui sont utilisés pour synthétiser les brins d'ADN complémentaires.
- Tampon, y compris les cations bivalents (généralement Mg²⁺) pour optimiser l'activité de la polymérase.

1.4.3 Les étapes

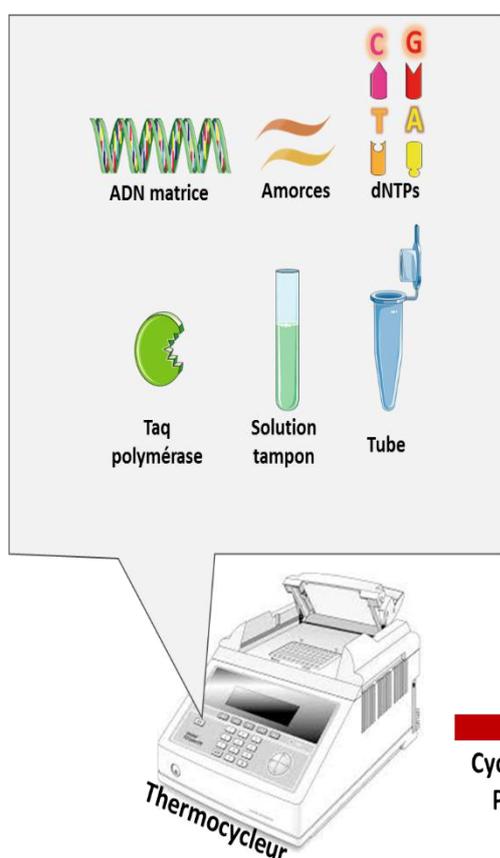
Tous les acteurs nécessaires à la réalisation de la PCR sont mis dans un tube à essai puis placé dans un thermocycleur programmables automatisés (machine PCR), est utilisé pour contrôler automatiquement la température et le temps requise pour chaque étape de la PCR et la détermination de la concentration optimale des composants de la réaction. Il y a trois étapes de base dans le processus d'amplification de l'ADN (figure 1.11) (Bhat and Rao, 2020)

- La dénaturation : est réalisée par chauffage de tube à 90–95°C pour séparer les deux brins d'ADN.
- L'hybridation ou amorçage : est réalisée en refroidissant le tube à 45–65°C (en fonction de la température de fusion des amorces) pour permettre l'hybridation des deux amorces avec les deux brins d'ADN.

- Elongation : Pendant cette étape, la température est élevée dans le tube à 72°C pour que la Taq polymérase synthétise des brins complémentaires de la matrice d'ADN en ajoutant des nucléotides libres à l'extrémité 3' de l'amorce.

Les trois étapes forment un cycle. En général, le cycle est répété 30 fois. Chaque partie d'ADN nouvellement synthétisée peut agir comme un nouveau modèle pour les cycles suivants. À la fin de 30 cycles, plusieurs millions de copies du produit souhaité peuvent être formés.

A. Acteurs de PCR



B. Etapes de PCR

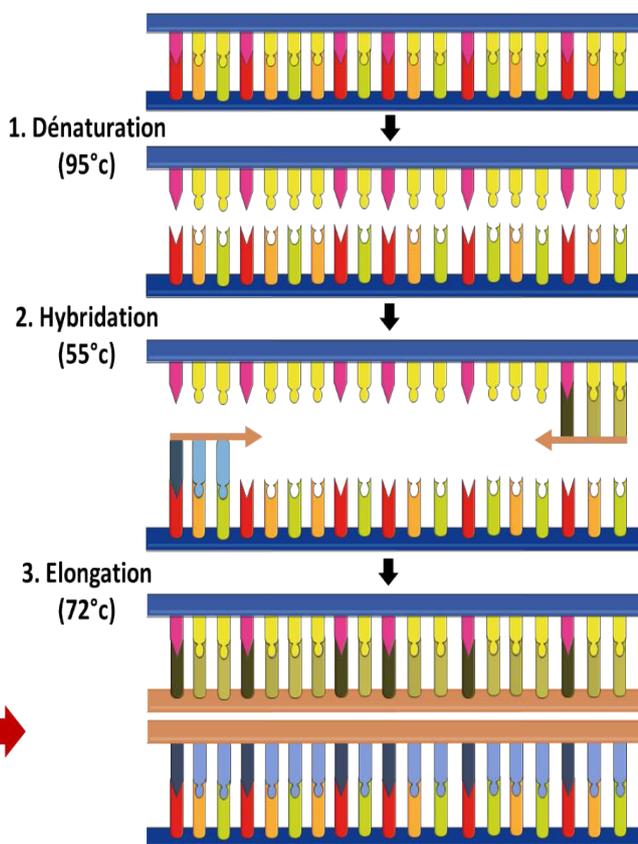
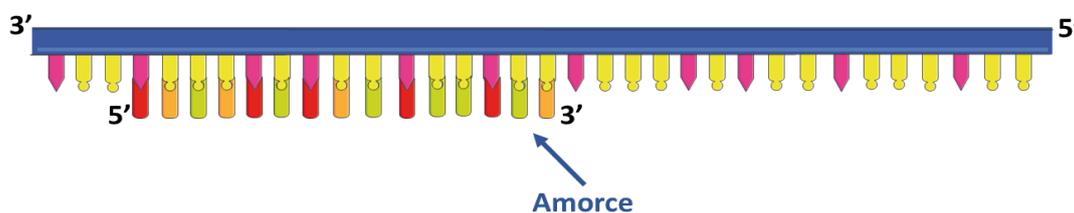


Figure 1.11. La technique de la PCR (Maheaswari et al., 2016). La réalisation d'un cycle de PCR nécessite la présence de plusieurs acteurs (ADN matrice, amorces, dNTPs, taq polymérase et trois étapes. Une fois tous les éléments rassemblés dans un tube à essai, l'étape1, permet de séparer les deux brins d'ADN à amplifier dans une température de 95°C. Dans l'étape2, le tube est refroidi à environ 55°C pour l'hybridation des deux brins d'ADN avec les deux amorces. Etape3, permet la synthèse des brins complémentaires par la Taq polymérase dans une température de 72°C. Ce cycle est répété entre 30 et 40 fois pour obtenir une amplification exponentielle de la séquence d'ADN cible (la durée d'un cycle est de l'ordre de la minute). Après n cycle de PCR, on aura 2^n copies de la séquence ciblée.

1.4.4 Choix d'amorce

1.4.4.1 Définition

Une amorce (ou "oligonucléotide" ou encore "primer") est une petite séquence d'ADN complémentaire à la région de l'ADN que l'on veut amplifier, utilisée dans le processus de la PCR dans le but d'initier le travail de la Taq polymérase et donc initiée la réplication de l'ADN. Le choix de bonne amorce est nécessaire pour garantir la reproductibilité et l'efficacité de la PCR (Touati, 2013).



1.4.4.2 Caractéristiques de bonne amorce

- La complémentarité (la spécificité) : l'amorce doit être spécifique à la région que l'on veut amplifier.
- Eviter la complémentarité entre l'amorce sens et anti-sens.
- Eviter l'auto-complémentarité dans chacune des amorces.
- Les amorces devraient avoir un rapport G+C d'environ 40 à 60% : car les appariements G-C étant plus stables que les appariements A-T.
- La taille de l'amorce entre 18 et 24 pb : pour ne se lier qu'à l'endroit voulu.
- Température de fusion (T_m) autour de 50°C : La température d'hybridation d'amorce dépend de sa valeur T_m qui se détermine par le calcul suivant : $T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$, où A, T, G et C représentent le nombre de nucléotides correspondants dans l'amorce. L'hybridation d'amorce peut échouer à une température trop haute que T_m , tandis que des températures bien inférieures à T_m aboutissent à une amplification non spécifique.

La spécificité des amorces peut être vérifiée à l'aide de BLAST (outil de recherche d'alignement local de base) suite du Centre national d'information sur la biotechnologie (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La conception soignée des amorces est nécessaire pour avoir des produits souhaités avec un rendement élevé (Bhat and Rao, 2020 ; Alonso et al., 2018).

Chapitre 1. Revue de la littérature

Dans le tableau suivant, on a montré l'utilisation de plusieurs différentes amorces du gène *Fas* par les chercheurs pour détecter, étudier et identifier plusieurs résultats via l'utilisation de la technique PCR ou RT-PCR (rétrotranscriptase PCR).

Tableau 1.3. Les différentes amorces du gène *Fas* et leurs utilisations.

Amorce utilisée (lecture 5'____3')	Cellule	Test	But à identifier	Références
F : CTACGGTTCTGCTCTATATGC R : GTTGGAGACTTTCTCCATCA	Cellules ganglionnaires de la rétine	RT-PCR	La rétinopathie diabétique	DOI : 10.18240/ijo 2019.07.05
F : GAGCTCGTCTCTGATCTCGC R : AAAGAGCTTCCCCAACTCCG	Cellules de la plaque terminale cartilagineuses	PCR quantitative	La discopathie cervicale	DOI : 10.3892/etm. 2017.5403
F : CTGCATCATGATGGCCAATTCTGC R : ATGACACTAAGTCAAGTTAAAGGC	Cellules myocardiques	RT-PCR	Lésion d'ischémie-reperfusion	DOI : 10.26355/eur rev_201907_ 18344
F : CAGACATGCTGTGGATCTGG R : CACAGTGTTACAGCCAGGA	Cellules de peau	RT-PCR	La dermatite atopique	DOI : 10.1007/s000 11-017 1049-z

1.5 Problématique et objectifs

1.5.1 Problématique

L'apoptose est largement connu comme un type de mort cellulaire programmée où la cellule va se suicider en réponse à divers stimuli. Ce suicide cellulaire est important au développement normal d'un organisme ainsi qu'au maintien de la surveillance immunitaire. Cependant, l'altération de processus de l'apoptose entraîne le développement de nombreuses pathologies telles que la progression tumorale. Par ailleurs, le récepteur de la mort Fas peut déclencher l'apoptose dans les cellules tumorale lorsqu'il est activé par son ligand FasL pour assurer l'immunité anti-tumorale.

Dans ce travail, nous essayons de concevoir des amorces spécifiques au gène *Fas* pour la réalisation de PCR pour étudier le rôle de ce gène dans l'apoptose des cellules tumorales en assurant l'immunité anti-tumorale.

1.5.2 Objectif :

Concevoir soigneusement des amorces permettant d'encadrer la séquence à amplifier du gène Fas pour garantir la reproductibilité et l'efficacité de la PCR.

1.5.3 But

Montrer que les amorces conçues sont spécifiques à la séquence que l'on veut amplifier et faciliter aux chercheurs la réalisation de PCR pour mieux comprendre l'implication et le mécanisme du gène Fas dans l'immunité anti-tumorale.

Chapitre 2

Matériel et méthodes

2.1. Conception d'amorce	25
2.2. Sélection des amorces	25
2.3. La séquence d'intérêt du gène Fas	26
2.4. Le design des primer	27
2.5. Les critères d'une bonne amorce	28

Chapitre 2

Matériel et méthodes

2.1. Conception d'amorce

La conception des amorces optimales est l'une des étapes critiques pour une amplification par PCR réussie. Par conséquent, une paire d'amorces mal conçue peut empêcher le fonctionnement et la productivité de la réaction PCR et donc inhiber la formation du produit souhaité (Bustin and Huggett, 2017). La conception optimale de l'amorce comprend des critères tels que la longueur de l'amorce, les températures de fusion, la composition de la base, la complémentarité et les séquences 3' (Wu et *al.*, 2004).

2.2. Sélection des amorces

2.2.1. La longueur de l'amorce

Généralement la taille optimale des amorces varie de 15 à 30 nucléotides. Des amorces plus courtes ou plus longues qui puissent mieux correspondre à la séquence cible peuvent diminuer la spécificité et l'efficacité de l'amplification par PCR (Rodríguez et *al.*, 2015).

2.2.2. Températures de fusion

La T_m des amorces est un paramètre important pour effectuer des tests PCR réussies. Habituellement, la valeur T_m des amorces est comprise entre 55 et 60°C. De plus, les valeurs T_m des amorces sens et anti-sens doivent être similaires (Rodríguez et *al.*, 2015). Des tests PCR peuvent être effectués avec succès si la différence entre les t_m des amorces ne dépasse pas 5°C (Chuang et *al.*, 2013).

2.2.3. La spécificité

Il est important de déterminer si une paire d'amorces s'hybride à la région cible ou si une amorce réapparaît dans la séquence matrice d'ADN ou la séquence génomique pour qu'une expérience de PCR ne peut être échouer. La spécificité garantit que l'amorce conçu peut détecter une séquence spécifique pour éviter des résultats de PCR invalides (Chuang et *al.*, 2013).

2.2.4. La complémentarité

Les amorces doivent être conçues sans aucune homologie intra-amorce pour éviter la formation des épingles à cheveux ou inter-amorce. L'homologie partielle dans les régions centrales de l'amorces sens et anti-sens peut interférer avec l'hybridation. Si l'homologie se situe à l'extrémité 3' de l'une ou de l'autre amorce, entrainera la formation de dimères d'amorce, ce qui, par compétition, empêchera la formation du produit désiré (BELAID, 2017).

2.2.5. Contenu de l'amorce GC

Idéalement les amorces doivent avoir un rapport G+C de 40% à 60% pour assurer une dénaturation efficace pendant le cyclage thermique, ce qui conduit à une réaction plus efficace (Green and Sambrook, 2018).

2.2.6. La séquence à l'extrémité 3'

L'inclusion d'un résidu G ou C à l'extrémité 3' des amorces est essentielle pour empêcher le désamorçage. Les résidus GC contribuent à la fixation correcte à l'extrémité 3' en raison de leurs liaisons hydrogènes qui sont plus forte que les résidus AT. Cela contribue également à une plus grande efficacité de la PCR (BELAID, 2017).

2.3. La séquence d'intérêt du gène Fas

La conception des bonnes amorces commence par la recherche de la séquence du gène *Fas* à partir de la base de données « Ensemble » par l'accès au site « www.Ensembl.org » (figure 2.1).

Chapitre 2. Matériel et méthodes

The screenshot displays the Ensembl genome browser interface. At the top, the navigation bar includes the Ensembl logo, links for BLAST/BLAT, VEP, Tools, BioMart, Downloads, Help & Docs, and Blog, along with a search bar and a Login/Register link. Below the navigation bar, there are sections for 'Tools' (All tools, BioMart, BLAST/BLAT, Variant Effect Predictor), a search bar with 'Human' and 'FAS' entered, and a 'Go' button. The main content area shows 'All genomes' (Pig breeds, Zebrafish) and 'Favourite genomes' (Human, Mouse, Zebrafish). At the bottom, there are several utility buttons: 'Compare genes across species', 'Find SNPs and other variants for my gene', 'Gene expression in different tissues', 'Retrieve gene sequence', 'Find a Data Display', and 'Use my own data in Ensembl'.

Figure 2.1. Base de données Ensembl.

Une fois la séquence du gène *Fas* s'affiche au niveau de la plateforme Ensembl, on a choisi et encadrer la séquence d'intérêt qui correspond à l'exon 8 avec deux régions, une en avant de l'exon pour déterminer l'amorce sens (forward primer) et l'autre après pour déterminer l'amorce anti-sens (reverse primer).

2.4. Le design des primers

À l'aide du logiciel Primer-BLAST de la base de données NCBI « www.Ncbi.nlm.nih.gov », on peut concevoir les amorces recherchées comme montré dans les figures ci-dessous.

On a sélectionné et copier la séquence d'intérêt (exon 8) et la coller dans le Primer-BLAST puis renseigner la position du nucléotide du départ et de la fin de l'amorce sens et l'amorce antisens (figure 2.2).

Chapitre 2. Matériel et méthodes

Pour avoir les résultats dans une nouvelle fenêtre, on a coché "show results in a new window" en bas de la page, puis on a cliqué sur "Get primers".

The screenshot shows the Primer-BLAST web interface. At the top, there are logos for NIH (U.S. National Library of Medicine) and NCBI (National Center for Biotechnology Information), along with a "Sign in to NCBI" link. The main heading is "Primer-BLAST" with the subtitle "A tool for finding specific primers". Below this, there are navigation links: "Reset page", "Save search parameters", "Retrieve recent results", "Publication", and "Tips for finding specific primers".

The "PCR Template" section contains a text area with a DNA sequence: `GCTATAGGAATTTACGTGTCTGATTTACTAGGTTTAAAGTTTATTTTGTATCCATTCATCTCTGTGTGTCACTAT
TTTCTCACTCTCTTTAACTCTGTGAATTTTAAAGAGGTCATCTTATGATATTTTTCATCCAGCCATCCCAATATATA
TTTAACTTGTCCAGCTTTAGATTAATTTTGAAGATTTTGAAGGATACGTTTCCAGAGATCCAAAGTGAATAAAGTG
GCCCAATTTACAAAGTGCATTAATAAAGGATTTTCTGCGAGGCTTTTGAATTTCTCTCTGATTTTTTTTTT
CTAGATGTGAACATGGAATCATCAGGAAATGCACACTCACACCAACACCGAGTCCAAAGAGAGGATTAATTTTTTTA`. To the right of the sequence is a "Range" section with "From" and "To" input fields. The "From" field contains "1" and the "To" field contains "300". Below these are "Forward primer" and "Reverse primer" labels with corresponding input fields. The "Reverse primer" field contains "781".

The "Primer Parameters" section includes several input fields: "Use my own forward primer (5'-3' on plus strand)", "Use my own reverse primer (5'-3' on minus strand)", "PCR product size" (Min: 70, Max: 1000), "# of primers to return" (10), and "Primer melting temperatures (T_m)" (Min: 57.0, Opt: 60.0, Max: 63.0, Max T_m difference: 3).

The "Exon/intron selection" section includes: "Exon junction span" (No preference), "Exon junction match" (Min 5' match: 7, Min 3' match: 4, Max 3' match: 8), and "Intron inclusion" (checkbox: Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA). The "Intron length range" section has "Min" (1000) and "Max" (1000000) input fields.

Figure 2.2. Mise en place de la séquence d'intérêt par le Primer-BLAST.

2.5. Les critères d'une bonne amorce

Pour concevoir une amorce, elle doit être répond aux critères suivants :

- Choisir le couple d'amorces qui donne le moins de produits aspécifiques, afin d'amplifier que le produit étudié.
- L'amorce spécifique doit contenir moins de 1000 pb, car lors d'une PCR il est moins probable d'amplifier une séquence supérieure à 1000 pb.
- Les produits aspécifiques de l'amorce sélectionnée doivent être toute supérieurs à 1000 pb.
- Les températures d'hybridation de l'amorce sens et anti-sens doivent être les plus proches possibles, car la température d'hybridation lors d'une PCR est programmée en une seule température.
- La teneur en GC doit être proche de 40%

Chapitre 3

Résultats

3.1. Résultats de la conception des amorces	30
3.2. Interprétation des résultats	30
3.3. Confirmation des résultats	31

Chapitre 3

Résultats

3.1. Résultats de la conception des amorces

À la fin de ce processus les résultats apparaissent sous forme d'un tableau résumant les caractéristiques des deux oligonucléotides, puis le produit spécifique, en dessous, avec sa taille et ensuite tous les produits aspécifiques avec leur taille en paire de bases (figure 3.1).

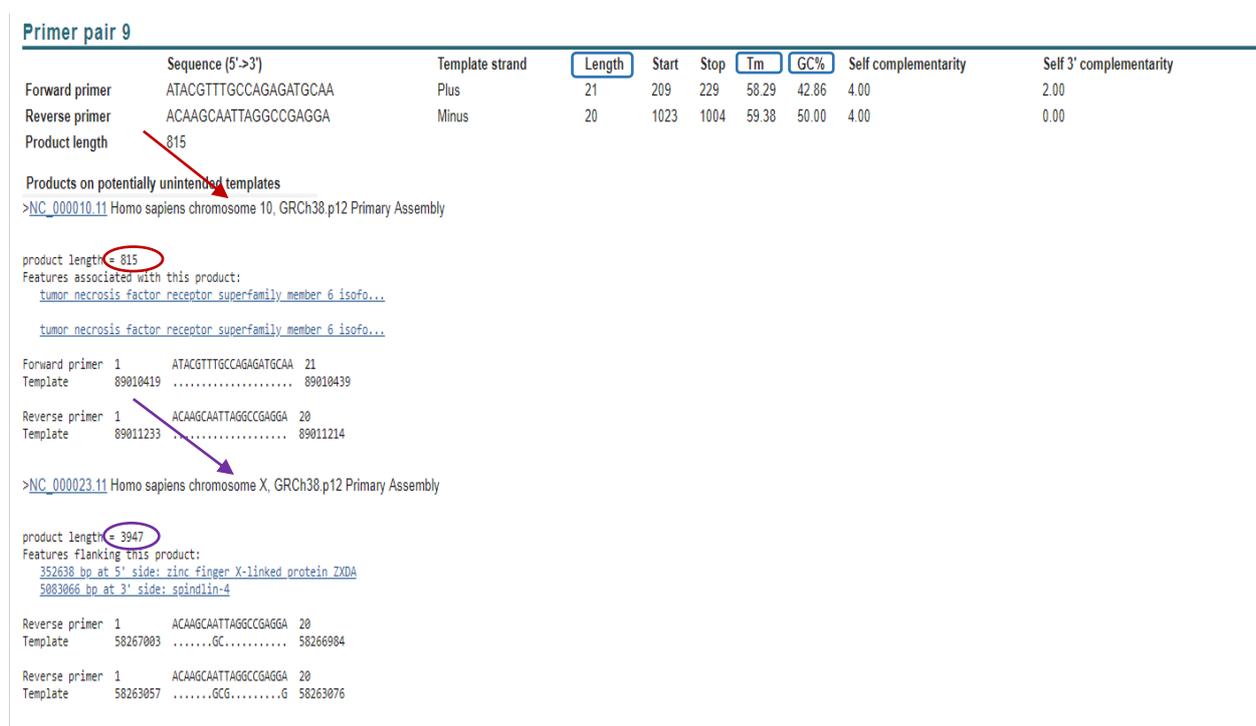


Figure 3.1. Résultats du Primer-BLAST concernant l'exon 8 du gène *Fas*.

3.2. Interprétation des résultats

Dans ce travail, nous avons utilisé le site Ensembl pour concevoir des amorces spécifiques de la séquence à amplifier, l'exon 8 du gène *Fas*, cette plateforme nous a montré que le gène *Fas* est composé de 16 introns et 15 exons, dans notre travail on s'est intéressé à l'exon 8.

Chapitre 3. Résultats

Grâce à l'utilisation du logiciel Primer-BLAST nous avons obtenu un couple d'amorce spécifique à la séquence d'intérêt (exon 8) qui permet d'obtenir un résultat de séquençage satisfaisant, qui est la paire 9 parmi les 10 paires d'amorces obtenus en raison de son respect des conditions signalées précédemment et décrites dans le tableau suivant :

Tableau 3.1. La comparaison entre les critères d'une bonne amorce et notre amorce.

Les critères	Taux optimale	Notre amorce
Longueur	15 à 30 nucléotides	Amorce sens 21 nucléotides Amorces anti-sens 20 nucléotides
Température de fusion	55°C et 60°C	Amorces sens (58.29°C) Amorces anti-sens (59.38°C)
Teneur en CG	40% à 60%	Amorces sens (42.86%) Amorces anti-sens (50%)
Produit spécifique	Inférieur à 1000 pb	815 pb
Produits aspécifiques	Supérieur à 1000 pb	Tous plus de 1000 pb

3.3. Confirmation des résultats

Pour la confirmation des résultats, nous avons soumis les séquences des amorces à une analyse de confirmation qui se fait par le site « <https://genome.ucsc.edu/> » qui est un autre programme d'optimisations des amorces conçues (figure 3.2).

Les résultats de cette confirmation nous ont donné la localisation de notre produit dans le chromosome 10, ce qui confirme que les amorces qui nous avons conçues sont fiables et spécifiques.

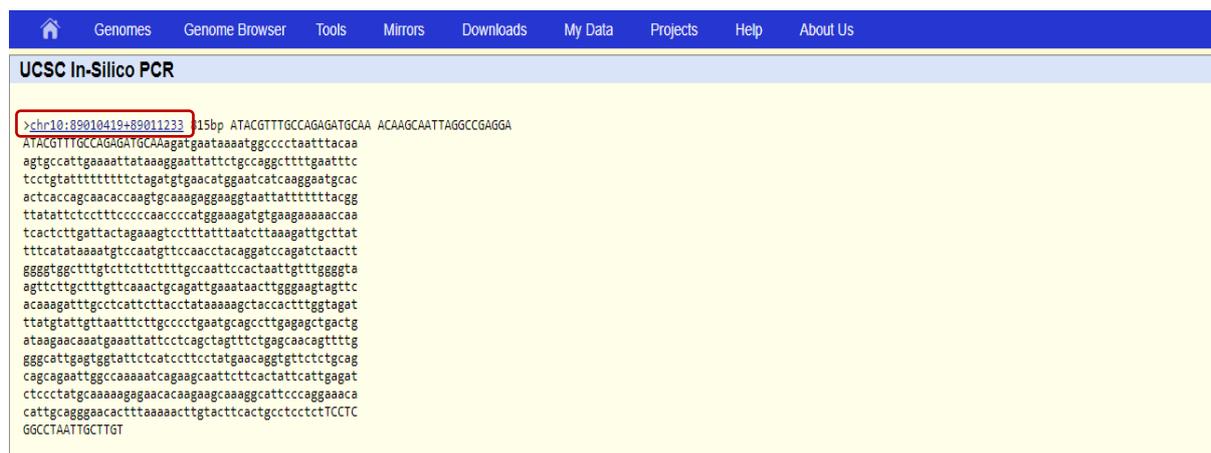


Figure 3.2. Confirmation des résultats par In-Silico PCR.

Chapitre 4

Conclusions

Chapitre 4

Conclusions

L'apoptose est un processus actif, contrôlé génétiquement, qui peut être déclenché par le système Fas/FasL, qui est le système extracellulaire le mieux caractérisé déclenchant de l'apoptose. La signalisation via Fas joue un rôle distinct dans le système immunitaire, où elle contribue à la régulation de la réponse anti-tumorale.

Puisque le cancer est devenu l'une des principales causes de décès dans le monde avec une prévalence de >10 millions de décès par an et puisque Fas a un rôle important dans la défense de l'organisme contre le cancer via l'élimination des cellules cancéreuses, les chercheurs utilisent la technique PCR pour mieux comprendre l'implication et le mécanisme de du gène *Fas* dans le déclenchement de l'apoptose dans les cellules tumorales afin d'assurer l'immunité anti-tumorale et confirmer son effet.

Dans une analyse biologique moléculaire qui comprend des tests PCR ou RT-PCR, la première étape essentielle est la conception des amorces spécifiques. Le choix de bonne amorce pour une séquence cible est assuré à l'aide des logiciels bioinformatiques notamment le logiciel Primer-BLAST, qui permet d'avoir le produit souhaité. Basé sur ce principe, l'étude moléculaire au niveau du gène *Fas* consiste à bien concevoir des amorces pour amplifier la séquence d'intérêt, pour que les chercheurs puissent les utiliser aux fins mentionnées ci-dessus.

Chapitre 5

Références bibliographiques

Chapitre 5

Références bibliographiques

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pillai, S. (2012). Cellular and molecular immunology (Philadelphia: Saunders/Elsevier).

Alonso, G.C., Pavarina, A.C., Sousa, T.V., and Klein, M.I. (2018). A quest to find good primers for gene expression analysis of *Candida albicans* from clinical samples. *Journal of Microbiological Methods* 147, 1–13.

Arnott, J.A., and Sonia Lobo (2020). Hormones of Programmed Cell Death. In *Hormonal Signaling in Biology and Medicine*, (Elsevier), pp. 13–42.

BELAID, N. (2017). Elaboration d'amorces pour le gène de la Glutathion peroxydas 3 GPx3. UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEN.

Bhat, A.I., and Rao, G.P. (2020). Characterization of Plant Viruses Methods and Protocols.

Bustin, S., and Huggett, J. (2017). qPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification* 14, 19–28.

Chan, K., Wong, P.-Y., Yu, P., Hardick, J., Wong, K.-Y., Wilson, S.A., Wu, T., Hui, Z., Gaydos, C., and Wong, S.S. (2016). A Rapid and Low-Cost PCR Thermal Cycler for Infectious Disease Diagnostics. *PLoS ONE* 11, e0149150.

Chang, B.J., Samal, A.B., Vlach, J., Fernandez, T.F., Brooke, D., Prevelige, P.E., and Saad, J.S. (2016). Identification of the Calmodulin-Binding Domains of Fas Death Receptor. *PLoS ONE* 11, e0146493.

Chuang, L.-Y., Cheng, Y.-H., and Yang, C.-H. (2013). Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnol Lett* 35, 1541–1549.

D'Arcy, M.S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int* 43, 582–592.

DUPLAQUET, L. (2018). Implication du récepteur à activité tyrosine kinase (RTK) MET sur la balance survie/apoptose et identification de nouvelles mutations de RTKs dans les cancers colorectaux métastatiques. Université de Lille – Ecole Doctorale Biologie - Santé.

Fu, Q., Fu, T.-M., Cruz, A.C., Sengupta, P., Thomas, S.K., Wang, S., Siegel, R.M., Wu, H., and Chou, J.J. (2016). Structural Basis and Functional Role of Intramembrane Trimerization of the Fas/CD95 Death Receptor. *Molecular Cell* 61, 602–613.

Fujita, T., Yuno, M., Kitaura, F., and Fujii, H. (2018). A refined two-step oligoribonucleotide interference-PCR method for precise discrimination of nucleotide differences. *Sci Rep* 8, 17195.

Gallucci, S., Caricchio, R., and Cohen, P.L. (2020). Cell Death and Autoimmune Disease. In *The Autoimmune Diseases*, (Elsevier), pp. 291–303.

Chapitre 5. Références bibliographiques

- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E.S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D.W., et al. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* 25, 486–541.
- Glukhova, X.A., Trizna, J.A., Proussakova, O.V., Gogvadze, V., and Beletsky, I.P. (2018). Impairment of Fas-ligand-caveolin-1 interaction inhibits Fas-ligand translocation to rafts and Fas-ligand-induced cell death. *Cell Death Dis* 9, 73.
- Green, M.R., and Sambrook, J. (2018). Optimizing Primer and Probe Concentrations for Use in Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Assays. *Cold Spring Harb Protoc* 2018, pdb.prot095018.
- Gregory, C.D. (2016). *Apoptosis in Cancer Pathogenesis and Anti-cancer Therapy* (Cham: Springer International Publishing).
- Kakarla, R., Hur, J., Kim, Y.J., Kim, J., and Chwae, Y.-J. (2020). Apoptotic cell-derived exosomes: messages from dying cells. *Exp Mol Med* 52, 1–6.
- Ke, B., Tian, M., Li, J., Liu, B., and He, G. (2016). Targeting Programmed Cell Death Using Small-Molecule Compounds to Improve Potential Cancer Therapy: ANTICANCER COMPOUNDS TARGETING CELL DEATH. *Med. Res. Rev.* 36, 983–1035.
- Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., and Arihiro, K. (2006). Tumor-Driven Evolution of Immunosuppressive Networks during Malignant Progression. *Cancer Res* 66, 5527–5536.
- Kiraz, Y., Adan, A., Kartal Yandim, M., and Baran, Y. (2016). Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumor Biol.* 37, 8471–8486.
- Kishore Kumar, G., Rajesh Kumar, G., Mrudula Spurthi, K., Nivas, S., Chiranjeevi, P., Ali, A., Sahu, S.K., Pratibha, N., and Surekha Rani, H. (2016). Polymorphisms of extrinsic death receptor apoptotic genes (FAS -670 G>A, FASL -844 T>C) in coronary artery disease. *Apoptosis* 21, 558–565.
- Lamkanfi, M., and Dixit, V.M. (2010). Manipulation of Host Cell Death Pathways during Microbial Infections. *Cell Host & Microbe* 8, 44–54.
- Le Gallo, M., and Legembre, P. (2017). CD95 Stimulation with CD95L and DISC Analysis. *Methods Mol. Biol.* 1557, 11–18.
- Le Gallo, M., Poissonnier, A., Blanco, P., and Legembre, P. (2017). CD95/Fas, Non-Apoptotic Signaling Pathways, and Kinases. *Front. Immunol.* 8, 1216.
- Legembre, L.P. (2017). *CD95: Methods and Protocols* (New York, NY: Springer New York).
- Maheaswari, R., Kshirsagar, J.T., and Lavanya, N. (2016). Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology. *J Indian Soc Periodontol* 20, 128–135.
- Mehrbod, P., Ande, S.R., Alizadeh, J., Rahimizadeh, S., Shariati, A., Malek, H., Hashemi, M., Glover, K.K.M., Sher, A.A., Coombs, K.M., et al. (2019). The roles of apoptosis, autophagy and unfolded protein response in arbovirus, influenza virus, and HIV infections. *Virulence* 10, 376–413.
- Nada, H.R. (2016). Fas Receptor: An Overview. *Dermatol Open J* 1, 63–71.
- Nagata, S. (2018). Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 36, 489–517.

Chapitre 5. Références bibliographiques

- Nagata, S., and Tanaka, M. (2017). Programmed cell death and the immune system. *Nat Rev Immunol* 17, 333–340.
- Nowak, K.L., and Edelstein, C.L. (2019). Apoptosis and autophagy in polycystic kidney disease (PKD). *Cellular Signalling* 109518.
- O' Reilly, E., Tirincci, A., Logue, S.E., and Szegezdi, E. (2016). The Janus Face of Death Receptor Signaling during Tumor Immunoediting. *Front. Immunol.* 7.
- Peter, M.E., Hadji, A., Murmann, A.E., Brockway, S., Putzbach, W., Pattanayak, A., and Ceppi, P. (2015). The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. *Cell Death Differ.* 22, 549–559.
- Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., and D'Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)* 8, 603–619.
- Qadir, A.S., Stults, A.M., Murmann, A.E., and Peter, M.E. (2020). The mechanism of how CD95/Fas activates the Type I IFN/STAT1 axis, driving cancer stemness in breast cancer. *Sci Rep* 10, 1310.
- Redza-Dutordoir, M., and Averill-Bates, D.A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1863, 2977–2992.
- Rezaei, N. (2015). *Cancer Immunology: A Translational Medicine Context* (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg).
- Rezaei, N. (2020). *Cancer Immunology: A Translational Medicine Context*.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Córdoba, J.J., and Andrade, M.J. (2015). Design of Primers and Probes for Quantitative Real-Time PCR Methods. In *PCR Primer Design*, C. Basu, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 31–56.
- Rossin, A., Miloro, G., and Hueber, A.-O. (2019a). TRAIL and FasL Functions in Cancer and Autoimmune Diseases: Towards an Increasing Complexity. *Cancers (Basel)* 11.
- Rossin, A., Miloro, G., and Hueber, A.-O. (2019b). TRAIL and FasL Functions in Cancer and Autoimmune Diseases: Towards an Increasing Complexity. *Cancers (Basel)* 11.
- Sakurai, T., Kamiyoshi, A., Takei, N., Watanabe, S., Sato, M., and Shindo, T. (2019). Bindel-PCR: a novel and convenient method for identifying CRISPR/Cas9-induced biallelic mutants through modified PCR using *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Sci Rep* 9, 9923.
- Seyrek, K., and Lavrik, I.N. (2019). Modulation of CD95-mediated signaling by post-translational modifications: towards understanding CD95 signaling networks. *Apoptosis* 24, 385–394.
- Sharma, S., Carmona, A., Skowronek, A., Yu, F., Collins, M.O., Naik, S., Murzeau, C.M., Tseng, P.-L., and Erdmann, K.S. (2019). Apoptotic signalling targets the post-endocytic sorting machinery of the death receptor Fas/CD95. *Nat Commun* 10, 3105.
- Sidstedt, M., Rådström, P., and Hedman, J. (2020). PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions. *Anal Bioanal Chem* 412, 2009–2023.

Chapitre 5. Références bibliographiques

- Stephan, M., Edelman, B., Winoto-Morbach, S., Janssen, O., Bertsch, U., Perrotta, C., Schütze, S., and Fritsch, J. (2017). Role of caspases in CD95-induced biphasic activation of acid sphingomyelinase. *Oncotarget* 8, 20067–20085.
- Touati, S. (2013). Conception des amorces encadrant le SNP rs6232 du gène PCSK1 associé à l'obésité. UNI VERS! TE DE TLEMEN - ABOU-BEKR BEL KAID.
- Tower, J. (2015). Programmed cell death in aging. *Ageing Research Reviews* 23, 90–100.
- Trejo-Solis, C., Serrano-Garcia, N., Escamilla-Ramírez, Á., Castillo-Rodríguez, R.A., Jimenez-Farfan, D., Palencia, G., Calvillo, M., Alvarez-Lemus, M.A., Flores-Nájera, A., Cruz-Salgado, A., et al. (2018). Autophagic and Apoptotic Pathways as Targets for Chemotherapy in Glioblastoma. *Int J Mol Sci* 19.
- Ucker, D.S., and Levine, J.S. (2018). Exploitation of Apoptotic Regulation in Cancer. *Front. Immunol.* 9, 241.
- Van Cruchten, S., and Van den Broeck, W. (2002). Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis. *Anatom Histol Embryol* 31, 214–223.
- Wang, H., and Zhang, X.-J. (2019). Apoptosis Imaging. In *Nuclear Medicine in Oncology*, G. Huang, ed. (Singapore: Springer Singapore), pp. 215–223.
- Wang, Y., Wang, F., Wang, H., and Song, M. (2017). Graphene oxide enhances the specificity of the polymerase chain reaction by modifying primer-template matching. *Sci Rep* 7, 16510.
- Wu, D., and Wu, W. (2019). Battery Powered Portable Thermal Cycler for Continuous-Flow Polymerase Chain Reaction Diagnosis by Single Thermostatic Thermoelectric Cooler and Open-Loop Controller. *Sensors (Basel)* 19.
- Wu, J.-S., Lee, C., Wu, C.-C., and Shiue, Y.-L. (2004). Primer design using genetic algorithm. *Bioinformatics* 20, 1710–1717.
- Xu, X., Lai, Y., and Hua, Z.-C. (2019a). Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci. Rep.* 39.
- Xu, X., Lai, Y., and Hua, Z.-C. (2019b). Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci. Rep.* 39.
- Yamada, A., Arakaki, R., Saito, M., Kudo, Y., and Ishimaru, N. (2017). Dual Role of Fas/FasL -Mediated Signal in Peripheral Immune Tolerance. *Front Immunol* 8, 403.
- Yan, H., Hong, Y., and Cai, Y. (2019). Association between FAS gene -670 A/G and -1377 G/A polymorphisms and the risk of autoimmune diseases: a meta-analysis. *Bioscience Reports* BSR20191197.
- Zhong, Y., Huang, L., Zhang, Z., Xiong, Y., Sun, L., and Weng, J. (2016). Enhancing the specificity of polymerase chain reaction by graphene oxide through surface modification: zwitterionic polymer is superior to other polymers with different charges. *Int J Nanomedicine* 11, 5989–6002.