

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE de TLEMCEM  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

## Département de Biologie

*Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et d'Immunologie W04144100*

# MEMOIRE

Présenté par

**DIB Sirine**

*En vue de l'obtention du*

**Diplôme de MASTER**

En Immunologie

## Thème

**Conception des amorces du gène *BCL-2* associé à l'immunité antitumorale**

Soutenu le 07 Septembre 2020, devant le jury composé de :

Président	ARIBI Mourad	Professeur	Université de Tlemcen
Encadreur	NOUARI Wafa	MCB	Université de Tlemcen
Examineur	MILIANI Marwa	MAB	Université de Tlemcen

**Année universitaire 2019/2020**



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE de TLEMCEM  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

## Département de Biologie

*Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et d'Immunologie W04144100*

# MEMOIRE

Présenté par

**DIB Sirine**

*En vue de l'obtention du*

**Diplôme de MASTER**

En Immunologie

## Thème

**Conception des amorces du gène *BCL-2* associé à l'immunité antitumorale**

Soutenu le 07 Septembre 2020, devant le jury composé de :

Président	ARIBI Mourad	Professeur	Université de Tlemcen
Encadreur	NOUARI Wafa	MCB	Université de Tlemcen
Examineur	MILIANI Marwa	MAB	Université de Tlemcen

**Année universitaire 2019/2020**



## Résumé

**Introduction :** Le cancer est l'une des causes majeures de mortalité dans le monde. L'immunité anti-tumorale joue un rôle important dans la défense de l'organisme contre les tumeurs, et est également responsable du contrôle de la majorité des tumeurs. Le gène *BCL-2* est responsable de l'apoptose cellulaire qui est supposée avoir un effet anti-tumoral.

**Objectif :** L'objectif de ce travail consiste à concevoir des amorces spécifiques au gène *BCL-2* associé à l'immunité anti-tumorale.

**Matériels et méthodes :** La conception des amorces pour le gène *BCL-2* a été effectuée en utilisant l'outil Primer-Blast du site « [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov) ».

**Résultats :** A cause des produits aspécifiques supérieurs à 1000 paires de bases, la seconde paire des amorces a été choisie. Cette paire répond également à tous les critères des bonnes amorces.

**Conclusion :** la paire des amorces choisie servira à amplifier par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) le gène *BCL-2* afin d'étudier son rôle dans l'immunité anti-tumorale.

**Mots clés :** Cancer, Gène *BCL-2*, PCR, Amorces.

**Abstract**

**Introduction:** Cancer is one of the leading causes of death in the world. Anti-tumor immunity plays an important role in the body's defense against tumors, and is also responsible for the control of the majority of tumors. The *BCL-2* gene is responsible for cell apoptosis that is supposed to have an anti-tumor effect.

**Objective:** The aim of this study is to design primers specific to the *BCL-2* gene associated with anti-tumor immunity.

**Materials and methods:** The design of primers for the gene *BCL-2* was performed using the Primer-Blast tool from the Site "[www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)".

**Results:** Because of the nonspecific products greater than 1000 base pairs, the second pair of primers was chosen. This pair also meets all the criteria for good primers.

**Conclusion:** the selected pair of primers will be used to amplify by polymerase chain reaction (PCR) the *BCL-2* gene in order to study its role in antitumor immunity.

**Keywords:** Cancer, *BCL-2* gene, PCR; Primers.

### ملخص

**مقدمة:** السرطان هو أحد الأسباب الرئيسية للوفاة في العالم. تلعب المناعة المضادة للأورام دورًا مهمًا في الدفاع عن الجسم ضد الأورام، كما أنها مسؤولة عن السيطرة على غالبيتها. الجين *BCL-2* مسؤول عن موت الخلايا المبرمج الذي يعتقد أنه له تأثير مضاد للورم.

**الهدف:** الهدف من هذا العمل هو تصميم برايمر خاص بجين *BCL-2* المرتبط بمناعة المناعة ضد الأورام.

**المواد والأساليب:** تم تصميم البرايمر خاص بجين *BCL-2* باستعمال الاداة primer-Blast من الموقع. [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)

**النتائج:** بسبب المنتجات غير النوعية التي تزيد عن 1000 زوج أساسي، تم اختيار الزوج الثاني من البرايمر. يفي هذا الزوج أيضًا بجميع معايير البرايمر الجيدة.

**الخلاصة:** سيتم استخدام الزوج المختار لتضخيم الجين *BCL-2* بواسطة تفاعل سلسلة بوليميراز (PCR) من أجل دراسة دوره في مناعة مضادة للأورام.

**الكلمات المفتاحية:** السرطان، جين *BCL-2*، PCR، البرايمر.

**Avant-propos**

Je remercie Allah le tout puissant de m'avoir guidé, et donné la foi et le courage pour accomplir ce travail.

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliqué et d'Immunologie (BIOMOLIM), Université de Tlemcen, sous la direction du Professeur Mourad ARIBI qui m'a ouvert les portes de son laboratoire et m'avoir assuré dans les meilleures conditions et assuré une excellente formation. J'ai l'honneur et le privilège d'avoir effectué mes travaux dans votre laboratoire.

A l'issue de ce travail, je tiens à remercier Madame NOUARI Wafa, Maître de Conférences classe B, Université de Tlemcen de m'avoir donnée la chance de travailler sous ses ailes et de m'assurer une excellente formation. Merci du fond du cœur.

Je tiens à remercier les membres du jury, Pr ARIBI Mourad et Mm MILIANI Marwa d'avoir accepté d'examiner ce travail, malgré leurs obligations professionnelles.

J'exprime également ma sincère reconnaissance à toute l'équipe du Laboratoire BIOMOLIM pour leur aide, ainsi toutes les informations et les avantages donnés durant la formation de Master.

J'exprime ma gratitude à Madame MESSOUAD Aida pour son temps ainsi pour ses précieux conseils.

Je remercie tous mes amies et collègues de la spécialité Immunologie pour le soutien et les encouragements.

*Je dédie ce travail à mes parents, mes sœurs et mon frère, ainsi que mon gendre qui m'ont soutenu et cru en moi jusqu'au bout ainsi à toute ma famille qui ont su me soulager avec les mots qu'il faut.*

*Je remercie mes chères amies : Amina, Ahlem, Wafaa, Tema, Latifa, Manel et toutes les personnes que j'estime.*

## Table des matières

<b>Résumé</b>	<b>III</b>
<b>Abstract</b>	<b>IV</b>
<b>ملخص</b>	<b>V</b>
<b>Avant-propos</b>	<b>VI</b>
<b>Table des matières</b>	<b>VII</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>X</b>
<b>Liste de tableaux</b>	<b>XI</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>XII</b>
<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1. Revue de la littérature</b>	<b>3</b>
1. Cancer	3
1.1. Généralité	3
1.2. Caractéristiques des cellules tumorales	3
1.3. Cancer et immunité	4
1.3.1. Les étapes de l'immunoediting	6
1.3.1.1. Elimination	6
1.3.1.2. Phase d'équilibre	7
1.3.1.3. Phase d'échappement	8
2. Gène <i>BCL-2</i>	9
2.1.1. Définition	9
2.1.2. Les membres de la familles BCL-2	10
2.1.2.1. Les protéines BCL-2 anti-apoptotiques	10

2.1.2.2.	Les protéines BCL-2 pro-apoptotiques	10
2.1.2.3.	Protéines BH3 uniquement	11
2.1.3.	Structure du gène et des protéines BCL-2	11
2.1.4.	Rôle des protéines BCL-2	12
2.1.5.	Signalisation	13
2.1.6.	<i>BCL-2</i> et immunité anti-tumorale	14
2.1.7.	Polymorphisme	15
3.	PCR	15
3.1.	Définition	15
3.2.	Principe	15
3.3.	Les étapes de la PCR	16
4.	Problématique et objectives	17
4.1.	Objectif	17
4.2.	But	17
<b>Chapitre 2.</b>	<b>Matériel et méthodes</b>	<b>18</b>
1.	Conception de l'amorce	18
1.1.	La longueur de l'amorce	18
1.2.	La température de fusion (Tf)	18
1.3.	La spécificité et la complémentarité	18
1.4.	La teneur en G/C	19
1.5.	La séquence à l'extrémité 3'	19
2.	Conception des amorces pour amplifier le gène <i>BCL-2</i>	19
2.1.	Détermination de la séquence du gène <i>BCL-2</i>	19
2.2.	L'outil Primer-Blast	20

3. Confirmation des résultats par in silico PCR	<b>22</b>
<b>Chapitre 3. Résultats</b>	<b>23</b>
1. Résultats de Primer-Blast	<b>23</b>
2. Résultats d'In-Silico PCR	<b>25</b>
<b>Chapitre 4. Conclusion et perspective</b>	<b>26</b>
<b>Chapitre 5. Références bibliographiques</b>	<b>27</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1.1.</b> Les caractéristiques du cancer avec le ciblage thérapeutique	<b>4</b>
<b>Figure 1.2.</b> Le processus d'immunoediting	<b>5</b>
<b>Figure 1.3.</b> Phase d'élimination dans le phénomène d'immunoediting	<b>7</b>
<b>Figure 1.4.</b> Phase d'équilibre	<b>8</b>
<b>Figure 1.5.</b> La phase d'échappement de l'immunité tumorale	<b>9</b>
<b>Figure 1.6.</b> Localisation du gène <i>BCL-2</i> sur le chromosome 18humain	<b>10</b>
<b>Figure 1.7.</b> Les protéines BCL-2	<b>12</b>
<b>Figure 1.8.</b> L'apoptose par la voie intrinsèque	<b>14</b>
<b>Figure 2.1.</b> Plateforme de la base de données Ensembl	<b>19</b>
<b>Figure 2.2.</b> La séquence du gène <i>BCL-2</i> par la plateforme Ensembl	<b>20</b>
<b>Figure 2.3.</b> La séquence de l'exon 4 du gène <i>BCL-2</i>	<b>20</b>
<b>Figure 2.4.</b> Le site NCBI	<b>21</b>
<b>Figure 2.5.</b> L'outil Primer-Blast	<b>21</b>
<b>Figure 2.6.</b> Analyse de la séquence d'intérêt par le Primer-Blast	<b>22</b>
<b>Figure 2.7.</b> Le site In-Silico PCR	<b>22</b>
<b>Figure 3.1.</b> Résultats de l'outil Primer-Balst	<b>23</b>
<b>Figure 3.2.</b> Caractéristique de la paire d'amorce choisie	<b>24</b>
<b>Figure 3.2.</b> Résultats d'In-Silico PCR	<b>25</b>

Liste des tableaux

**Tableau 1.1** Les étape standard d'une PCR.

**16**

## Liste des abréviations

**A**

**ADN** : Acide désoxyribonucléique.

**B**

**BAD** : BCL-2 promoteur de la mort associé.

**BAK**: Bcl-2 homologous antagonist/killer.

**BAX** : BCL2 Associated X.

**BID** : Agoniste de la mort du domaine interactif BH3.

**BIK** : Tueur interactif BCL-2.

**BIM** : Médiateur interactif BCL-2.

**BOK** : Tueur ovarien apparenté à BCL-2.

**BCL2**: *B-cell lymphoma 2*.

**BCL-W**: Bcl2l2 inhibiteur.

**BCL-X<sub>L</sub>**: BCL extra-long.

**BMF** : Facteur de modification BCL-2.

**C**

**CD4<sup>+</sup>T cell** : T helper lymphocyte.

**CD8<sup>+</sup>T cell** : cytotoxic T lymphocyte.

**CMH I** : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I.

**CTLA4**: cytotoxicT-lymphocyte associated antigene-4.

**D**

**DC**: dendritic cell.

**E**

**ECM**: Matrice extracellulaire.

**H**

**Hrk**: Hara-kiri

**I**

**IDO**: indolamine2,3dioxygenase.

**IFN**: interferon.

**IL** : interleukin.

**M**

**MCL-1** : Protein Coding.

**MDCS**: Myeloid dendritic *cells*.

**MØ**: macrophage.

**N**

**NK**: natural killer.

**NKG2D**: natural killer Group2D.

**NKT cell**: natural killer T.

**NOXA**: Dommage.

**P**

**P53**: Protein 53

**PCR**: Polymerase Chain Reaction.

**PD1**: programmed cell death1.

**PDGF**: Platelet Derived Growth Factor.

**PUMA** : Modulateur régulé à la hausse de l'apoptose p53.

**R**

**ROS**: *Reactive oxygen species*.

**RT-PCR**: *Reverse transcription-polymerase chain reaction*.

**S**

**STAT3**: Signal transducer and activator of transcription 3.

**T**

**Taq Pol** : Taq polymerase.

**TDO**: Tryptophan dioxygenase.

**TCR**: *T-cell receptor*.

**TNF**: tumor necrosis factor.

**TGF- $\beta$** : transforming growth factor beta.

**TIL** : lymphocytes infiltrant les tumeurs.

**Treg** : lymphocytes *T* régulateurs.

**TRAIL** : tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand.

**$\gamma\delta$  t cells**: Gamma delta T cells.

## Introduction

### Introduction

Selon l'organisation mondiale de la santé, le cancer reste l'une des principales causes de mortalité dans le monde, après les accidents de la route et le suicide, avec environ 12,7 millions de cas. Ce nombre devrait passer à 15 millions d'ici la fin de 2020. Cette maladie caractérisée par une croissance cellulaire incontrôlée peut se développer par une activation des oncogènes, une désactivation des anti-oncogènes suppresseurs de tumeurs et aussi par l'inactivation du phénomène d'apoptose (Sarkar et *al.*, 2013) .

La surveillance immunitaire du cancer est considérée comme le phénomène clé de la protection du corps humain contre la tumeur par inhibition de la cancérogénèse d'une part, et le maintien de l'homéostasie cellulaire, d'autre part (Kim et *al.*, 2007). Elle se base sur la compréhension des interactions entre les cellules du système immunitaire et le développement du cancer. Il est important de noter que le système immunitaire joue un double rôle : soit il élimine la formation tumorale par son éradication, soit il favorise la croissance tumorale (Aragon-Sanabria et *al.*, 2018).

La famille de B-cell lymphoma 2 (BCL-2), découverte en 1980, est connue pour son rôle dans l'apoptose (Warren et *al.*, 2019). Cette famille se constitue de protéines pro-apoptotiques, protéines anti-apoptotiques, et protéines à BH3 seulement (Tzifi et *al.*, 2012). Ces protéines sont conservées au cours de l'évolution et partagent un domaine d'homologie BCL-2 (BH) (Choudhury, 2019). Les protéines pro-apoptotiques BH-3 sont les seules à être capables de lier les protéines anti-apoptotiques, qui favorisent la libération des facteurs apoptotiques par la membrane externe mitochondriale, menant ainsi à la destruction cellulaire (Adams et *al.*, 2018).

La régulation métabolique du cancer et du métastase se produit par le fonctionnement de la famille des protéines pro et anti-apoptotiques, et le mécanisme d'interaction qui a permis un développement clinique grâce à des molécules inhibitrice spécifique, qui inhibent les interactions protéine-protéine (Campbell and Tait, 2018; Frenzel et *al.*, 2009), et éventuellement par les membres BH-3 seulement qui régulent par la suite la production de *reactive oxygen species* (ROS) (Um, 2016). Un déséquilibre entre les protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques peut engendrer un développement tumoral avec une résistance contre le traitement du cancer (Campbell and Tait, 2018). Ce déséquilibre va se traduire par une augmentation des protéines pro-apoptotiques qui agissent comme une barrière à l'apoptose même lors d'une régulation positive des protéines BH3 uniquement (Oltersdorf et *al.*, 2005).

## Introduction

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR : polymerase chain reaction) est une technique qui permet d'amplifier un fragment d'ADN en utilisant l'enzyme ADN polymérase. Cette dernière synthétise le brin complémentaire en ajoutant des nucléotides. La première étape pour réaliser une PCR est de concevoir une paire d'amorces spécifique au gène qu'on veut amplifier dans le but d'étudier son rôle.

Dans ce contexte, ce travail a pour objectif de concevoir des amorces spécifiques au gène *BCL-2* associé à l'immunité anti-tumorale.

## Chapitre 1. Revue de la littérature

### Chapitre 1. Revue de la littérature

#### 1. Cancer

##### 1.1. Généralités

La plus ancienne description du cancer a été apparue en 1600 avant JC par d'Edwin Smith sur le papyrus. Les médecins hippocratiques ont attribué l'origine du mot cancer, qui utilise les termes *Karkinos* pour le gonflement et *karkinoma* pour les cancers non cicatrisants (Papavramidou et *al.*, 2010). Le terme cancer désigne littéralement plusieurs maladies partageant des caractéristiques communes (Benz, 2017), par une prolifération cellulaire anormale (Hanahan and Weinberg, 2000), ou par invasion de structures vitales proches et propagation à des sites distants appelés métastase (Benz, 2017). Cette maladie affecte n'importe quels tissus de l'organisme (Jemal et *al.*, 2007).

Les mutations augmentent le nombre de récepteur des facteurs de croissance, tout en favorisant la prolifération cellulaire qui peuvent amplifier les cellules malignes, ou elle va stimuler elle-même la croissance ; avec l'augmentation de la synthèse des acides gras par élimination de la  $\beta$  oxydation et des nucléotides (Romero-Garcia et *al.*, 2011).

Plusieurs facteurs peuvent causer le cancer. Ces facteurs comprennent le régime alimentaire, l'hygiène de vie, expositions professionnelles, (Clapp et *al.*, 2008).

Le changement du caractère génétique est due à la perte de la fonction du génome par une modification du gène (Romero-Garcia et *al.*, 2011), et aussi les infections virales qui transmettent leurs génomes oncogènes à l'hôte (Blackadar, 2016; Tubiana, 2008).

L'augmentation du nombre de récepteurs des facteurs de croissance est due aux mutations génétiques dans les cellules cancéreuses. Les voies de signalisation intracellulaires qui favorisent la prolifération cellulaire peuvent être continuellement activées ou amplifiées, permettant aux cellules malignes de stimuler elles-mêmes la croissance et la prolifération maligne (Vogelstein and Kinzler, 2004).

##### 1.2. Caractéristiques des cellules tumorales

Les caractéristiques des cellules cancéreuses ont été décrites par Hanahan et Weinberg dans les années 2000 (**Fig 1.1**). Ces caractères comportent (Hanahan and Weinberg, 2011) :

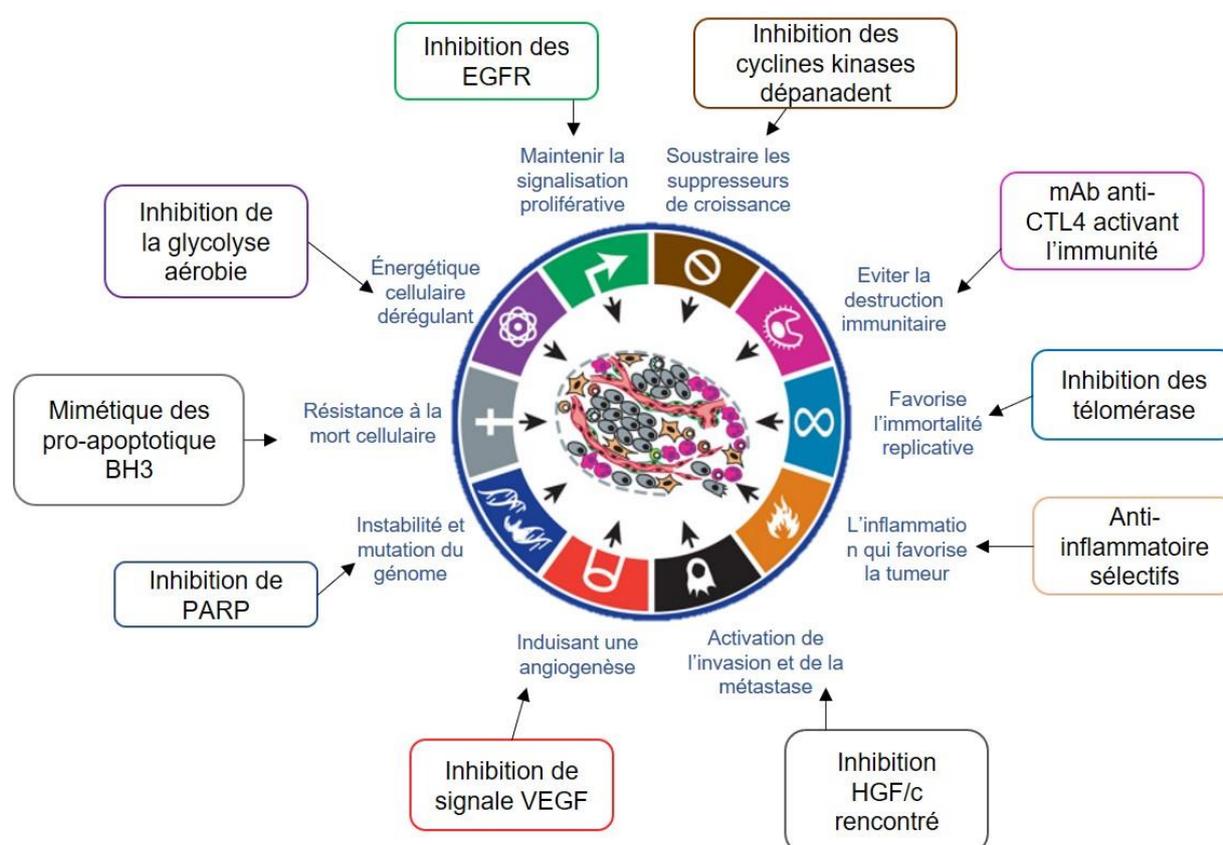
- Autosuffisance en signaux de croissance qui permet une multiplication cellulaire ;

## Chapitre 1. Revue de la littérature

- Insensibilité aux signaux anti-croissance et mécanisme anti-prolifératif ;
- Echappement au phénomène de l'apoptose ;
- Potentiel de réplication illimité ;
- L'angiogenèse soutenue ;
- L'invasion tissulaire et production aux métastases (Fouad and Aanei, 2017).

Deux caractéristiques ont récemment été ajoutées à la liste :

- L'évasion de la destruction immunitaire
- La reprogrammation du métabolisme énergétique (Hanahan and Weinberg, 2000; Romero-Garcia et, 2011).



**Figure 1.1 Les caractéristiques du cancer avec le ciblage thérapeutique (Hanahan and Weinberg, 2011).** Les médicaments expérimentaux sont développés pour cibler chacun des caractéristiques habilitantes et les caractéristiques émergentes, qui sont également prometteuses en tant que thérapeutique contre le cancer humain.

### 1.3 Cancer et immunité

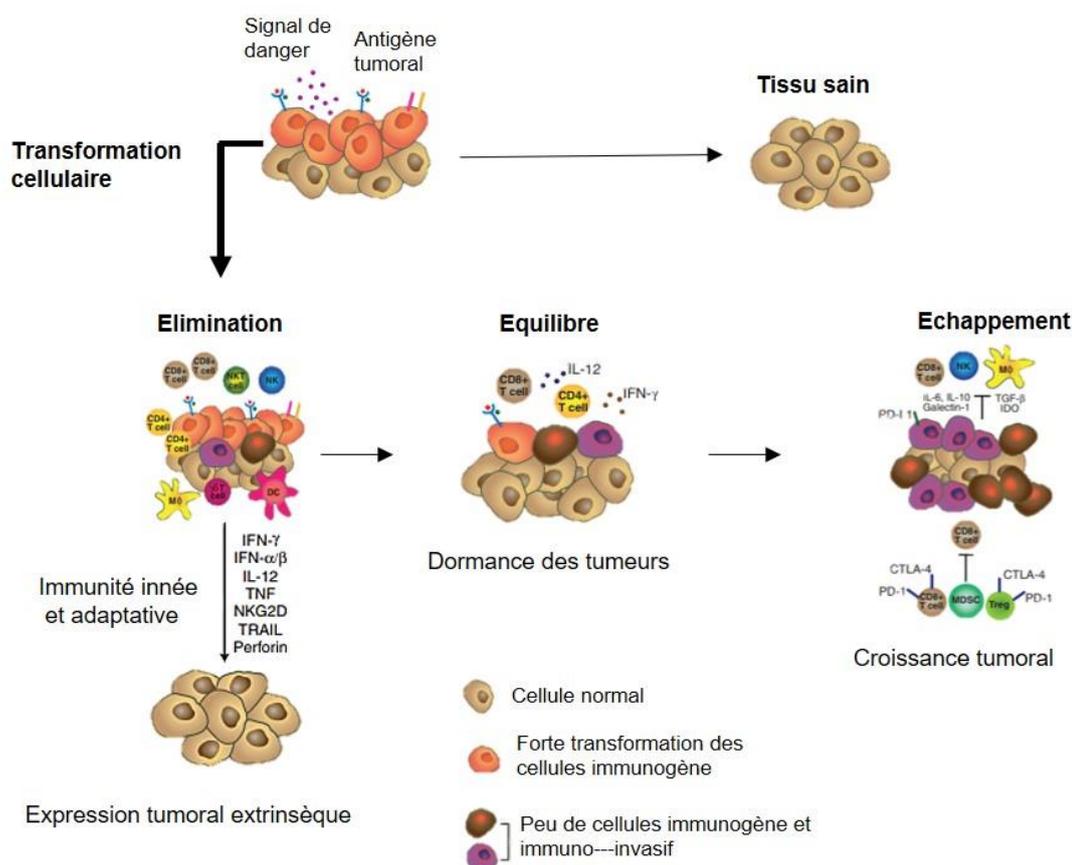
Le cancer et le système immunitaire ont une relation importante vu qu'il agit pour défendre le corps humain et cette fonction implique trois principes de base : il détecte les antigènes « non soi » contre les agents pathogènes, il englobe des fonctions effectrices pour cibler et détruire spécifiquement le pathogène ou les cellules

## Chapitre 1. Revue de la littérature

infectées tout en protégeant l'hôte ; et il développe une mémoire immunologique *via* les réponses immunitaires adaptatives (Pandya *et al.*, 2016).

Les tumeurs primaires et métastatiques sont des environnements assez complexes composés de cellules néoplasiques, de matrice extracellulaire (ECM) et de cellules néoplasiques, qui comprennent des cellules résidentes de soutien mésenchymateuses, des cellules endothéliales et des cellules immunitaires inflammatoires infiltrées qui représentent les cellules les plus liées au cancer (Gonzalez *et al.*, 2018).

L'immunosurveillance est un concept utilisé par le système immunitaire contre le cancer lors du processus d'immunoediting. L'immunoediting du cancer est un processus composé de trois phases (**Fig 1.2**) : la phase d'élimination également appelée Immunosurveillance du cancer, la phase d'équilibre et la phase d'échappement face à la tumeur (Dunn *et al.*, 2004a).



**Figure 1.2. Le processus d'immunoediting (Schreiber *et al.*, 2011).** IFN :interféron, NK :natural killer, NKT cell: natural killer T, CD8<sup>+</sup>T cell: cytotoxic T lymphocyte, CD4<sup>+</sup>T cell: T helper lymphocyte,DC : dendriticcell, IL :interleukin, MØ: macrophage, MDCS: Myeloiddendritic cells, NKG2D :natural killer Group2D, TRAIL :tumornecrosis factor relatedapoptosisinducing ligand, CTLA4 :cytotoxicT-lymphocyte associated antigene-4,PD1 :programmedcell death1 ,Treg:lymphocytes T régulateurs ,TGF-β:transforminggrowth factor beta,γδ t cells: Gamma delta T cells, IDO :indolamine2,3dioxygenase ,TNF : tumornecrosis factor.

## Chapitre 1. Revue de la littérature

### 1.3.1 Étapes de l'immunoediting

#### 1.3.1.1 Élimination

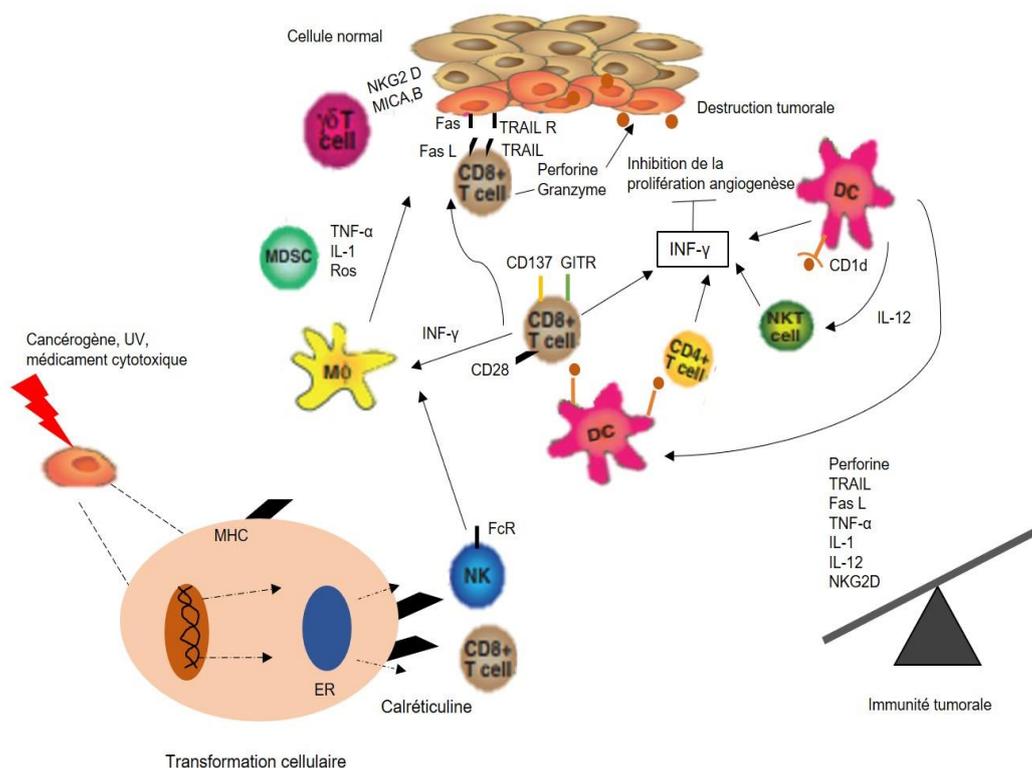
La surveillance immunitaire a un concept original qui est l'élimination du cancer par une éradication des cellules tumorales en développement, en collaboration avec le mécanisme intrinsèque de suppression des tumeurs. Ce processus comprend des réponses immunitaires innées et adaptatives contre les cellules tumorales (Kim et *al.*, 2007).

Au cours du développement tumoral, il y a le recrutement des cellules de l'immunité innée, telles que, les cellules NKT, les cellules T $\gamma\delta$ , les cellules NK et / ou les macrophages. Ces cellules ont la capacité de reconnaître les antigènes tumoraux grâce à l'interaction du *T-cell receptor* (TCR) et de son ligand NKG2D par le phénomène d'inflammation, cela permet la libération des cytokines telles que l'IFN- $\gamma$ , qui sont nécessaire dans la réponse anti-tumorales (Dunn et *al.*, 2004b), ainsi les cellules tumorales sont maintenues dans un état de dormance par une réaction immunitaire (Wu et *al.*, 2013).

Le phénomène d'élimination passe par quatre étapes :

- Les cellules de l'immunité innée vont reconnaître les cellules tumorales et assurer leur destruction.
- Maturation et migration des CD et migration des cellules T vers le site tumoral.
- Génération des cellules T spécifiques de l'antigène tumoral, en activant des mécanismes cytotoxiques tels que la perforine, TRAIL et l'oxygène réactif.
- Accueil des cellules T spécifiques de l'antigène au site pour l'élimination des cellules tumorales (**Fig 1.3**) (Kim et *al.*, 2007).

## Chapitre 1. Revue de la littérature



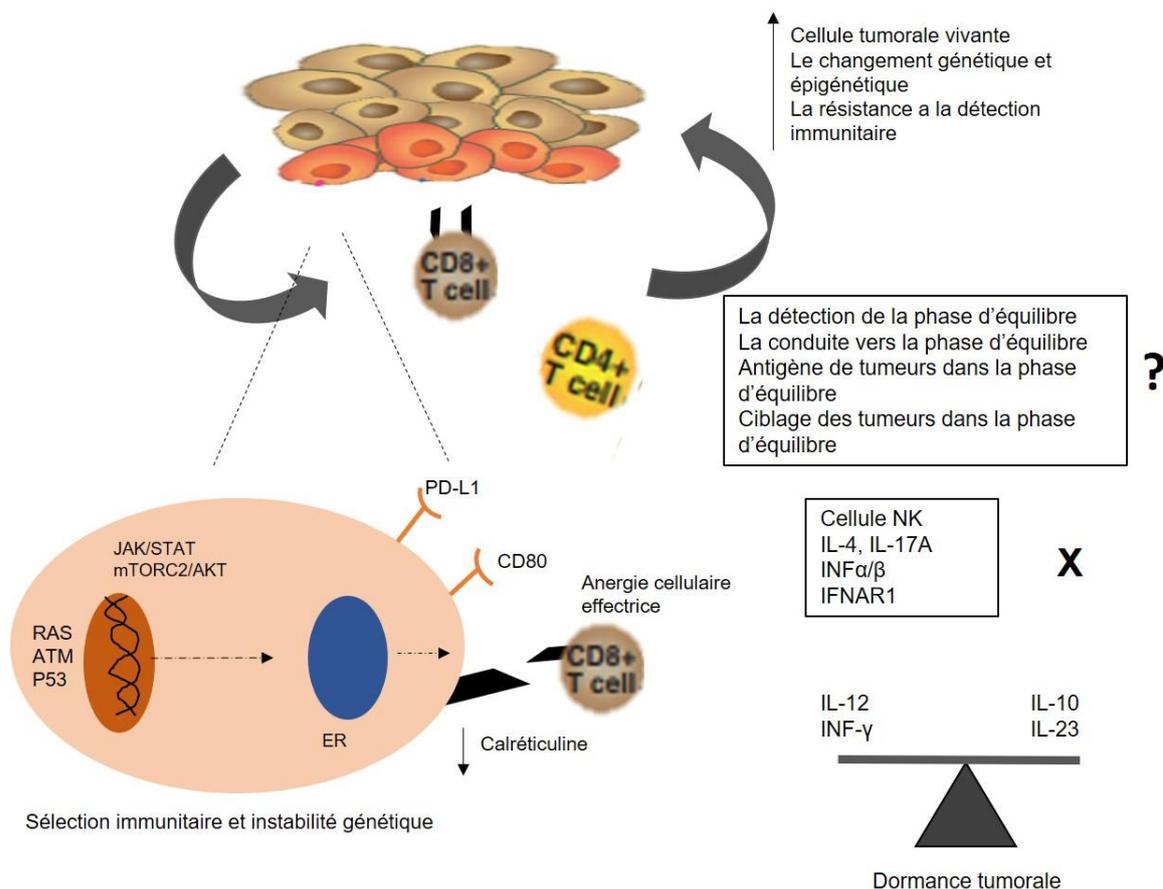
**Figure 1.3. Phase d'élimination dans le phénomène d'immunoediting (Mittal et al., 2014).** L'élimination est une phase d'immunoediting du cancer où le système immunitaire inné et adaptatif détectent et détruisent ensemble les tumeurs précoces avant qu'elles ne deviennent cliniquement visibles.

### 1.3.1.2 Phase d'équilibre

Au cours de cette phase, une sculpture continue des cellules tumorales produit des cellules résistantes aux cellules immunitaires effectrices (Kim et al., 2007). Les lymphocytes et l'IFN-γ exercent une pression de sélection puissante et cruelle sur les cellules tumorales mais pas assez efficace pour détruire les nombreuses cellules qui sont génétiquement instables et mutantes. La fin de la phase d'équilibre se traduit par une nouvelle population de clones tumoraux à immunogénicité, arrangés dans une population parentale hétérogène par le biais du système (Dunn et al., 2004b).

La phase d'équilibre (**Fig1.4**) permet de maintenir les cellules tumorales latentes résiduelles dans un état de dormance fonctionnel pendant une période de temps considérable. Si la population de cellules tumorales change en réponse aux fonctions d'édition du système immunitaire et / ou à un état immunosuppresseur est établie dans le microenvironnement tumoral, les cellules tumorales peut alors entrer dans la phase d'évasion, devenant progressivement néoplasmes visibles (Wu et al., 2013).

## Chapitre 1. Revue de la littérature



**Figure 1.4. Phase d'équilibre (Mittal et al., 2014).** Dans cette phase, le système immunitaire maintient la tumeur dans un état de dormance fonctionnel.

### 1.3.1.3 Phase d'échappement

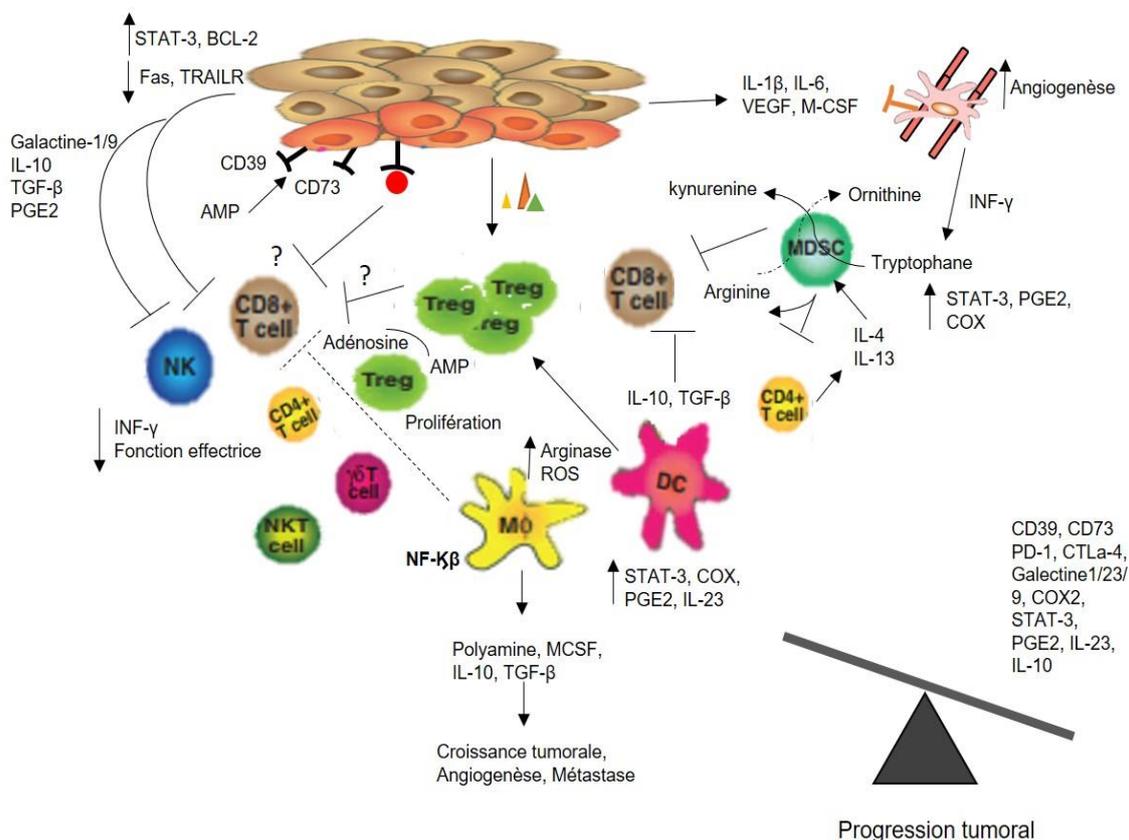
Dans cette phase, le système immunitaire ne peut pas irradiier ou limiter la croissance tumorale (**Fig 1.5**) (Dunn et al., 2004a).

Le TCR est un récepteur qui se trouve à la surface des LT, qui fait partie du complexe TCR-CD3 fonctionnant comme un seul transducteur lors de la liaison à l'antigène. Dans la phase d'échappement, il va y avoir la perte de la chaîne CD3- $\zeta$  du transducteur de signal (CD3- $\zeta$ ) des lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL), permettant ainsi l'évasion des cellules tumorales dans la coopération des cytokines immunosuppressives telles que le TGF- $\beta$  et l'IL-10, ou par des mécanismes impliquant des cellules T régulatrices (Treg) ayant des activités immunosuppressives on inhibent les lymphocytes T (Dunn et al., 2004a; Kim et al., 2007).

Les cellules tumorales échappent à la reconnaissance immunitaire : (perte d'antigènes tumoraux, du Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH de classe I) ou de molécules de co-stimulation), par une augmentation de l'expression des molécules de résistance de Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) d'une part, de survie (molécule anti-apoptotique BCL-2), et

## Chapitre 1. Revue de la littérature

d'immunosuppression (IDO, tryptophandioxygénase (TDO), PD-L1, galectine-1/3/9, CD39, CD73, récepteurs de l'adénosine, d'autre part (Dunn et *al.*, 2004a). Ces cytokines immunosuppressives vont atténuer les cellules régulatrices, par le recrutement et la polarisation des macrophages M2 qui sécrètent à leur tour d'IL-4 et d'IL-13, et conduisent ainsi à l'expression du TGF- $\beta$ , l'IL-10 et le Platelet Derived Growth Factor (PDGF), qui inhibent les lymphocytes T (Vesely et *al.*, 2011).



**Figure 1.5. La phase d'échappement de l'immunité tumorale (Mittal et *al.*, 2014).** Pendant la phase d'évasion de l'immunoediting du cancer, le système immunitaire ne parvient pas à limiter la croissance tumorale et les cellules tumorales émergent, provoquant une maladie cliniquement apparente.

## 2. Gène *BCL-2*

### 2.1.1. Définition

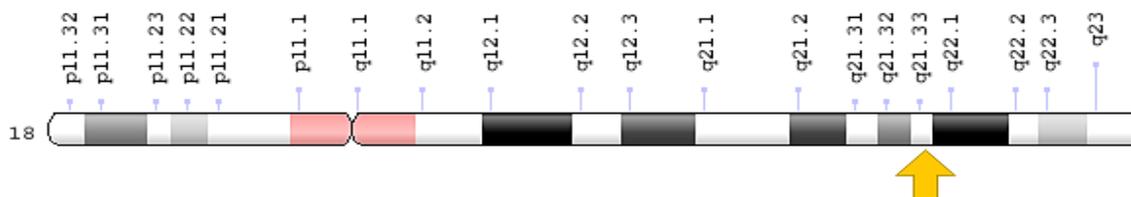
La première fois que le membre de la famille de protéine *BCL-2* a été décrit dans les années 1980, cette famille de protéine est découverte chez les patients ayant un lymphome folliculaire (Birkinshaw and Czabotar, 2017), ce gène est situé près de la jonction des chromosomes 14 et 18 (t14; 18) (**Fig 1.6**) (Hardwick and Soane, 2013).

La famille de gènes du lymphome 2 à cellules B (*BCL-2*) code pour plus de 20 protéines (Ashkenazi et *al.*, 2017), qui ont un rôle principal dans la régulation de l'intégrité mitochondriale, la programmation de la mort apoptotique (Flores-Romero

## Chapitre 1. Revue de la littérature

and García-Sáez, 2019), et l'équilibre entre la survie et la mort cellulaires (Ashkenazi et al., 2017).

L'homéostasie cellulaire normale semble dépendre de la balance entre les membres pro et anti-apoptotiques de la famille BCL-2 (Opferman and Kothari, 2018a).



**Figure 1.6. Localisation du gène *BCL-2* sur le chromosome 18 humain (D'après NCBI).**

### 2.1.2. Les membres de famille du gène *BCL-2*

La famille de protéines BCL-2 est un régulateur clé de la mort cellulaire programmée ou appelé l'apoptose intrinsèque ou mitochondriale (Anilkumar and Prehn, 2014; Opferman and Kothari, 2018b). Ces protéines sont classées en trois différentes classes en fonction de leurs propriétés structurales et fonctionnelles.

#### 2.1.2.1. Les protéines BCL-2 anti-apoptotiques

La sous famille des protéines anti-apoptotiques comprend BCL-2 elle-même, BCL-X<sub>L</sub> (BCL-extra long), MCL-1 (Protein Coding) et BCL-W (Bcl2l2 inhibiteur) qui contiennent quatre domaines BH (1-4), et une partie terminale C hydrophobe (Anilkumar and Prehn, 2014; Tzifi et al., 2012). Le sillon hydrophobe est formé par les domaines BH1-BH3, avec un domaine BH4 N-terminal qui permet la stabilité de cette structure. Le domaine BH4 est un facteur clé pour l'activité anti- apoptotique souvent inactif dans les protéines apoptotiques (Tzifi et al., 2012).

#### 2.1.2.2. Les protéines BCL-2 pro-apoptotiques

La sous famille des protéines pro-apoptotiques comprend BAX (BCL-2-associée x protéine), BAK (BCL-2-antagonist / killer-1) et potentiellement BOK (tueur ovarien apparenté à BCL-2), (Anilkumar and Prehn, 2014) qui contient trois domaines (BH1-BH3) (Tzifi et al., 2012) conservés et interagit fortement avec certaines protéines anti-apoptotiques (Anilkumar and Prehn, 2014). La protéine BAX est une protéine monomère dans le cytosol qui s'intègre dans la mitochondrie pendant l'apoptose, entraînant ainsi la libération des facteurs apoptogènes comme le cytochrome c et l'activation des caspases. Le manque d'un domaine BH3 peut engendrer une activation des protéines BAX par le P53. (Tzifi et al., 2012). De plus, La protéine BAK est une

## Chapitre 1. Revue de la littérature

protéine membranaire mitochondriale intégrale, qui subit également des changements structuraux pour former de plus grande accumulation lors de l'apoptose (Tzifi et al., 2012).

### 1.2.2.3. Protéines BH3 uniquement

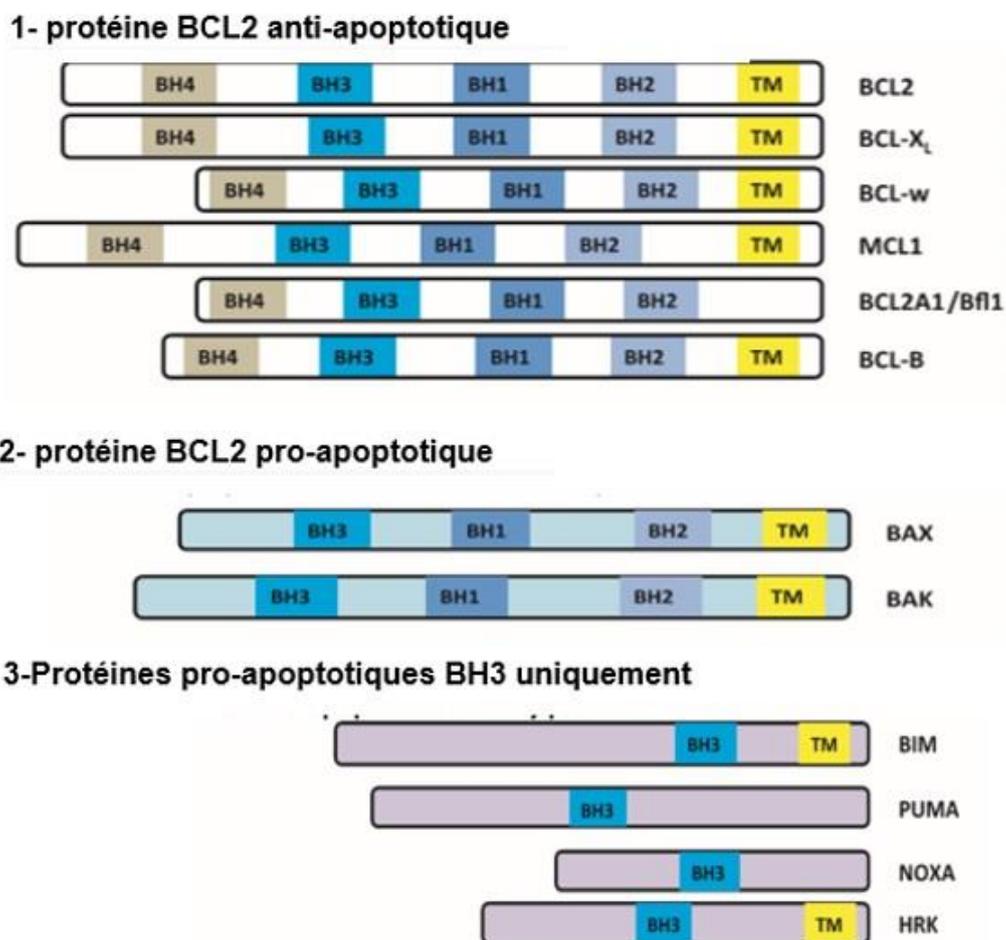
Les protéines BH3 uniquement comprennent BIM (médiateur interactif BCL-2), PUMA (modulateur régulé à la hausse de l'apoptose p53), BID (agoniste de la mort du domaine interactif BH3), BIK (tueur interactif BCL-2), BAD (BCL-2 promoteur de la mort associé), BMF (facteur de modification BCL-2), Hrk (Harakiri) et NOXA (dommage) (Birkinshaw and Czabotar, 2017; Happonen et al., 2012) qui ont une homologie avec les protéines de la famille BCL-2 dans un seul domaine (Anilkumar and Prehn, 2014).

### 2.1.3. Structure du gène et des protéines BCL-2

Le gène *BCL-2* code pour une protéine de la membrane mitochondriale externe intégrale qui bloque la mort apoptotique de certaines cellules telles que les lymphocytes. Ce gène se localise dans les chromosomes 14 et 18, dans un emplacement de 18q21.33, avec la présence de 6 exons (D'après NCBI). Ce gène code pour une protéine BCL-2.

La famille de protéines BCL-2 est caractérisée par la présence de quatre motifs de séquence proportionnellement courts appelés domaines d'homologie BCL-2 (Tzifi et al., 2012).

Les structures tridimensionnelles des membres de cette famille se constituent principalement de deux hélices alpha centrales, principalement hydrophobes avec une longue boucle non structurée présente entre les deux hélices alpha, entourées de six ou sept hélices alpha amphipathiques de longueurs variables (**Fig 1.7**) (Petros et al., 2004).



**Figure 1.7. Les protéines BCL-2.** Représentation de protéines BCL-2 sélectionnées avec leurs domaines BH, et leurs domaines transmembranaire (TM).

#### 2.1.4. Rôle des protéines BCL-2

Les protéines BCL-2 pro et anti-apoptotiques sont considérées comme des protéines clés pour la régulation apoptotique qui permet le contrôle de l'homéostasie contre le développement d'un cancer ou la perturbation de l'intégrité mitochondriale (Frenzel et *al.*, 2009). Ce mécanisme se passe par une régulation classique de l'apoptose par laquelle les protéines BCL-2 anti-apoptotiques se lient et inhibent les protéines pro-apoptotiques en contrôlant la libération du cytochrome c dans la voie intrinsèque du mitochondrie (Hardwick and Soane, 2013), où l'apoptose est dépendante des caspases 'caspases-3, caspases-9, et Apaf1 (Zheng et *al.*, 2000). La suppression des protéines BCL-2 favorise la tumorigène, où les membres de la famille BCL-2 pro-apoptotique puissent fonctionner comme des suppresseurs de tumeurs (Coultas and Strasser, 2003).

## Chapitre 1. Revue de la littérature

Le BAD favorise la mort cellulaire en antagonisant les protéines BCL-2 anti-apoptotiques, le BAD endogène et exogène protège fortement les cellules dérivées de la mort neuronale (Hardwick and Soane, 2013). Enfin, le Bax permet la mort cellulaire dans le système nerveux central au cours du développement, par l'élimination des neurones nés déjà morte de manière dépendante de BAX (Sun et *al.*, 2004).

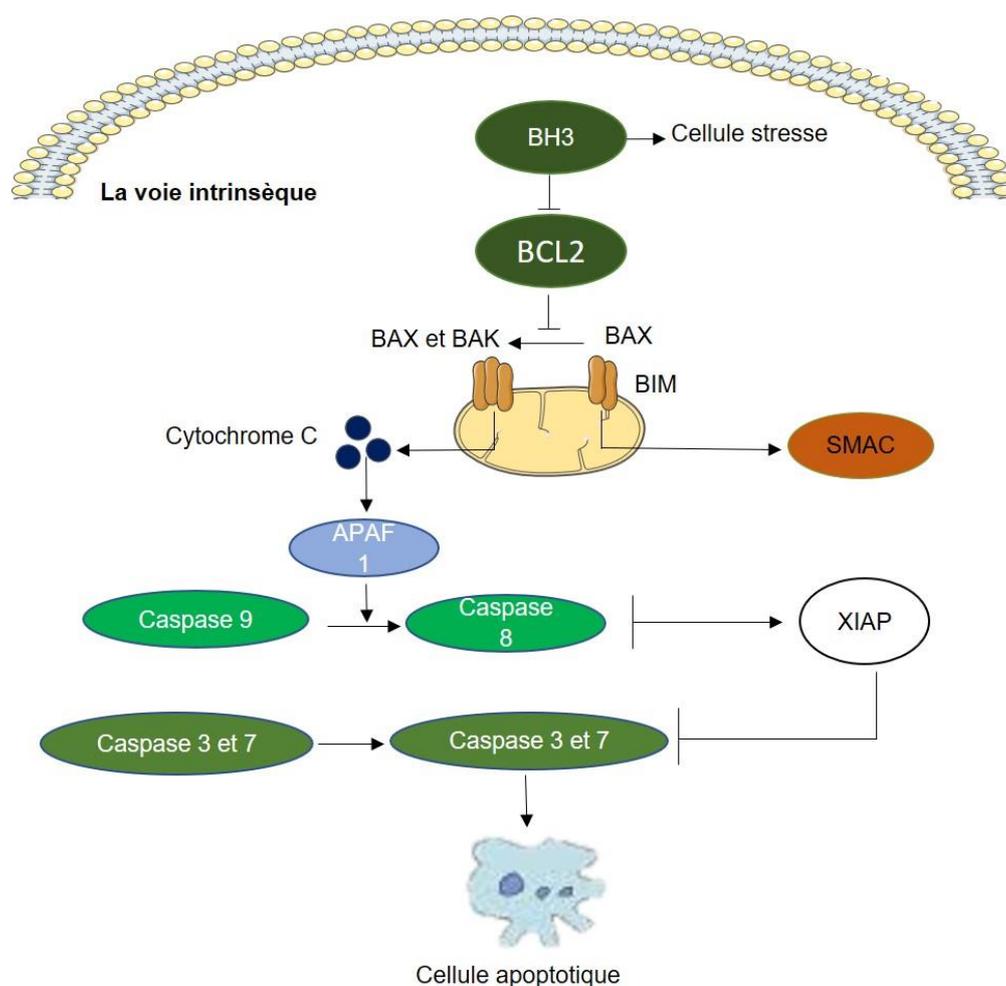
Les différents sous-groupes de protéines BH3 permet à l'organisme d'induire sélectivement l'apoptose en surveillant de nombreux différents types de stress cellulaire qui peuvent être limités à certains sites subcellulaires (Shamas-Din et *al.*, 2013).

### 2.1.5. Signalisation

Les mitochondries sont des organites actifs qui peuvent se changer leur nombre et leur morphologie dans les cellules saines (Chan, 2006). Le rôle majeur et essentiel des mitochondries est de fournir une myriade de services à la cellule, y compris la production d'énergie, le tampon calcique et la régulation de l'apoptose (McBride et *al.*, 2006).

L'autodestruction est un mécanisme appelé mort cellulaire programmée ou apoptose impliqué dans une variété d'événement biologique (par la dynamique Ca<sup>2+</sup> + des RE et des mitochondries modulées par la BCL-2). Il existe de multiples voies cellulaires qui permettent le déclenchement de l'apoptose. Parmi elles, la voie intrinsèque pour laquelle la mitochondrie est l'organe central qui réagit avec les membres de la familles BCL-2 pro et anti-apoptotique (**Fig 1.8**) (Jeong and Seol, 2008). Dans la voie respiratoire, il y a la libération de ROS, un acteur clé dans l'invasion cellulaire. Les membres pro-apoptotiques multidomaines suppriment l'invasion cellulaire en diminuant la production de ROS et permettant par la suite la suppression du phénomène apoptotique (Um, 2016).

## Chapitre 1. Revue de la littérature



**Figure 1.8. L'apoptose par la voie intrinsèque (Ashkenazi et al., 2017).** À la suite de l'activation de la voie intrinsèque par le stress cellulaire, les BH3 seulement inhibent les protéines anti-apoptotiques BCL-2. L'activation et l'oligomérisation subséquentes des protéines BAK, et BAX entraînent une perméabilisation de la membrane externe mitochondriale. Cela entraîne la libération du cytochrome c et du deuxième activateur de caspase dérivé des mitochondries (SMAC ; également connu sous le nom de DIABLO) des mitochondries. Le cytochrome c forme un complexe avec la procaspase 9 et le facteur d'activation de la protéase apoptose 1 (APAF1), ce qui conduit à l'activation de la caspase 9. La caspase 9 active ensuite la procaspase 3 et la procaspase 7, entraînant la mort cellulaire. L'inhibition de ce processus par les protéines BCL - 2 anti-apoptotiques se produit par séquestration des protéines pro-apoptotiques par liaison à leurs motifs BH3. BIM, médiateur de la mort cellulaire en interaction avec BCL - 2.

### 2.1.6. *BCL-2* et immunité anti-tumorale

Le *BCL-2* est une nouvelle cible dans l'immunité anti-tumorale qui utilise des stratégies de vaccination anticancéreuse combinée avec l'immunothérapie par l'ajout des cytokines, ou des agents immunomodulateurs. L'inhibition de l'apoptose est une caractéristique générale, et l'expression de gènes anti-apoptose, par la survivine ou la famille *BCL-2*, peut provoquer des effets anti-apoptotiques plus prononcés (Straten and Andersen, 2010).

Pour une inhibition de la prolifération des lignées cellulaires, il faut la combinaison des inhibiteurs MCL-1 et BCL-xL ou aussi les inhibiteurs MCL-1 et BCL-2 avec une signalisation dépendante aux protéines BCL-2.

## Chapitre 1. Revue de la littérature

Les lignées cellulaires cancéreuses vont être reconnues et lysées par des clones de cellules T spécifiques à BCL-2, et certaines par des cellules T spécifiques à BCL-X (Straten and Andersen, 2010).

Les lymphocytes et les lymphomes ont démontré qu'une expression assez importante de *BCL-2* n'inhibe non seulement l'apoptose, mais favorise aussi la survie à long terme et la croissance clonogénique continue (Coultas and Strasser, 2003).

### 2.1.7. Polymorphisme

Le dysfonctionnement du gène *BCL-2* est due à une mutation, cette dernière peut engendrer différentes maladies tel que le cancer, l'une des maladies les plus diagnostiquées. On cite : le cancer du sein, du poumon, du colorectal, de la prostate, et de l'estomac... (García-Aranda et al., 2018). La mutation peut également provoquer des maladies auto-immunes par une insensibilisation aux auto-antigènes se traduisant sous forme d'une tolérance (Li et al., 2006), mais aussi la schizophrénie qui est un trouble psychiatrique impliquant dans l'altération de l'apoptose neurale (Glantz et al., 2006).

## 3. PCR (Polymerase Chain Reaction)

### 3.1. Définition

La PCR est un test enzymatique simple, qui permet l'amplification d'un fragment d'ADN spécifique à partir d'un complexe d'ADN *in vitro* (Garibyan and Avashia, 2013; Maheaswari et al., 2016). Dans les années 80, la PCR a été développée par Kary Mullis, qui a reçu le prix Nobel en 1994 (Valones et al., 2009).

La PCR peut être effectuée en utilisant l'ADN (acide désoxyribonucléique) source d'une variété de tissus et d'organismes (Garibyan and Avashia, 2013). Elle est une excellente technique pour la détection rapide des agents pathogènes, y compris ceux qui sont difficiles à cultiver (Valones et al., 2009).

### 3.2. Principe

La technique de la PCR se base sur :

- L'ADN matrice est la séquence cible connue qui doit être amplifiée et sa longueur varie de 100 à 1 000 paires de bases ;
- La Taq polymérase (Taq pol) permet de relier les différents nucléotides : dGTP, dATP, dTTP, dCTP pour la synthèse de brin complémentaire.
- Des paires d'amorces contenant des amorces sens et anti-sens, de longueur de 16 à 20 paires de bases ;(Maheaswari et al., 2016).

## Chapitre 1. Revue de la littérature

### 3.3. Étapes de la PCR

Les étapes de déroulement de la PCR sont les suivantes (**Tab 1.1**) :

1. Dénaturation de l'ADN – (La séparation des brins d'ADN doubles en deux brins simples est réalisée par un chauffage à 94 °C)
2. Recuit primaire – (À 50–58 ° C, lorsque la paire d'amorces est mélangée avec l'ADN cible dénaturé, l'amorce directe s'hybride à un site spécifique à une extrémité de la séquence cible d'un brin cible, et l'amorce inverse s'hybride à un site spécifique à l'extrémité opposée de l'autre brin cible complémentaire)
3. Extension de la séquence d'ADN amorcée – (L'enzyme ADN polymérase synthétise de nouveaux brins complémentaires par l'extension d'amorces à 72 ° C. La Taq Pol est couramment utilisée en raison de sa capacité à fonctionner efficacement à des températures élevées) (Maheaswari et *al.*, 2016 ;Lorenz, 2012).

Une fois l'amplification s'est produite, de larges méthodes sont disponible pour détecter le produit. La plus simple est la migration par électrophorèse sur gel d'agarose (Lorenz, 2012), ou un gel polyacrylamide selon la taille du produit, qui apparaisse comme une seule bande ressemblant à la taille de la séquence amplifiée. Cette lumière est fluorescente lorsqu'elle est claire par la lumière ultraviolette (Maheaswari et *al.*, 2016).

**Tableau 1.1.** les étapes standard d'une PCR (Lorenz, 2012).

Les étapes des cycles	Température	Temps	Nombre de cycle
Dénaturation initiale	De 94°C à 98°C	1 minute	1
Dénaturation	94°C	De 10 à 60 secondes	25-35
Recuit	5°C	30 secondes	
Extension	De 70°C à 80°C	Dépendant de l'amplicon et de l'ADN polymérase	
Extraction finale	De 70°C à 80°C	5 minutes	1
Teneur	4°C	∞	1

## Chapitre 1. Revue de la littérature

### 4. Problématique et objectifs

#### 4.1. Problématique

Le cancer est une maladie caractérisée par la division anarchique des cellules stromales qui se transforment en cellules cancéreuses. Les cellules cancéreuses vont être éliminées par les réponses immunes innées et adaptatives. En revanche, ces cellules peuvent toutes de même échapper aux surveillances du système immunitaire et se développer en métastase. Le gène *BCL-2* code pour des protéines localisées sur la membrane externe de la mitochondrie qui jouent un rôle important dans la régulation de la mort cellulaire (apoptose).

Un déséquilibre entre les fonctions pro-apoptotiques et anti-apoptotiques des membres de protéines de la famille BCL-2 peut se traduire par une augmentation de la protéine pro-apoptotique qui joue un rôle de barrière apoptotique déclenchant ainsi un cancer. Dans ce travail, nous allons s'intéresser au gène *BCL-2* dont l'étude de son rôle nécessite la réalisation de plusieurs techniques de biologie moléculaire, notamment la PCR. La réussite de cette dernière exige l'utilisation de bonnes amorces afin d'amplifier correctement ce gène.

#### 4.2. Objectif

L'identification d'une séquence d'oligonucléotides qui servira d'une amorce pour une PCR.

#### 4.3. But

Ce travail consiste à concevoir des amorces spécifiques au gène *BCL-2* associé à l'immunité anti-tumorale.

## Chapitre 2. Matériel et méthodes

### Chapitre 2. Matériel et méthodes

#### 1. Conception des amorces

L'amorce est un court fragment d'ADN ou une séquence d'oligonucléotides simple brin de séquence connue qui est utilisée dans la technique de la PCR pour l'amplification de l'ADN (Glaser, 2005). Chacun de ces oligonucléotides hybrident un brin d'une séquence d'ADN cible de façon spécifique et complémentaire afin de démarrer la synthèse des séquences complémentaires à l'aide de l'ADN polymérase (Mackay, 2002).

La conception des amorces de la région spécifique est une étape préliminaire pour l'amplification de l'ADN. Une amorce doit être complémentaire au brin d'ADN et orientée dans le bon sens 5'→3' (Starks et al., 1976). Une amorce mal conçue peut engendrer un mauvais fonctionnement de la PCR, ou une faible production. La séquence d'amorce est obtenue par la synthèse chimique et détermine plusieurs paramètres, telles que la position et la longueur du produit, sa température de fusion et finalement le rendement (Jane Gurr, 1991).

Pour concevoir de bonnes amorces, plusieurs caractéristiques doivent être requises :

##### 1.1 La longueur d'amorce

Pour le succès de la PCR, une amorce doit avoir une longueur comprise entre 18 à 24 bases spécifiques de la séquence et une température d'hybridation moins de 50°C. Plus l'amorce spécifique est longue plus l'hybridation est moins efficace (Lorenz, 2012).

##### 1.2 La température de fusion (T<sub>f</sub>)

Pour un résultat meilleur, la température de fusion doit être comprise entre 55 et 75°C (Higgins et al., 2019).

##### 1.3 La spécificité et la complémentarité

Il faut que les amorces soient spécifiques et uniques de la région à amplifier du génome car l'amplification d'une autre région du génome donnera des produits aspécifiques. De plus, il faut que les amorces ne présentent aucune homologie intra-amorces ou inter-amorces car elles peuvent former des structures doubles brins (épingle à cheveux), ce qui provoquera par la suite une perturbation de l'hybridation (Jiang et al., 2018).

## Chapitre 2. Matériel et méthodes

### 1.4 La teneur en C/G

Une hybridation optimale nécessite un pourcentage de 50% en CG. De plus, il faut que l'amorce soit dépourvue de poly-C et de poly-G qui peuvent engendrer une hybridation non spécifique l'amorce (Lorenz, 2012).

### 1.5 La séquence à l'extrémité 3'

La mise en œuvre de l'extrémité 3' des amorces est primordiale pour la diminution du processus de désamorçage, car elle favorisent des liaisons d'hydrogènes plus entre les résidus CG, et ainsi éviter le phénomène de complémentarité (Ferrara et al., 2018).

Il est à noter que l'amorce spécifique choisi doit avoir un nombre inférieur à 1000 bases et les produits aspécifiques doivent être tous supérieur à 1000 bases.

## 2. Conception des amorces pour amplifier le gène *BCL-2*

### 2.1. Détermination de la séquence du gène *BCL-2*

La base de données « Ensembl » « [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) » est utilisée pour connaître la séquence du gène *BCL-2* (Fig 2.1).

The screenshot shows the Ensembl genome browser interface for the gene *BCL2* (ENSG00000171791). The page includes a navigation menu on the left, a header with search and login options, and a main content area with a table of transcripts and a summary section.

Name	Transcript ID	bp	Protein	Biotype	CCDS	UniProt	RefSeq Match	Flags
BCL2-202	ENST00000298117.1	7461	239aa	Protein coding	CCDS11981.0	A0A024R2B3 P10415	-	TSL:1   GENCODE basic   APPRIS P3
BCL2-201	ENST00000333681.5	6881	239aa	Protein coding	CCDS11981.0	A0A024R2B3 P10415	-	TSL:1   GENCODE basic   APPRIS P3
BCL2-203	ENST00000589955.2	5011	205aa	Protein coding	CCDS45882.0	A0A024R2C4 P10415	-	TSL:NA   GENCODE basic   APPRIS ALT2
BCL2-204	ENST00000590515.1	572	No protein	Processed transcript	-	-	-	TSL:4

**Summary**  
Name: *BCL2* (HGNC Symbol)  
CCDS: This gene is a member of the Human CCDS set: [CCDS11981.1](#); [CCDS45882.1](#)

Figure 2.1. Plateforme de la base de données Ensembl.

La figure 2.2 montre la séquence du gène *BCL-2*. Les caractères en rouges représentent les séquences codantes (exons), tandis que les caractères en noir représentent les séquences non-codantes (introns).

## Chapitre 2. Matériel et méthodes

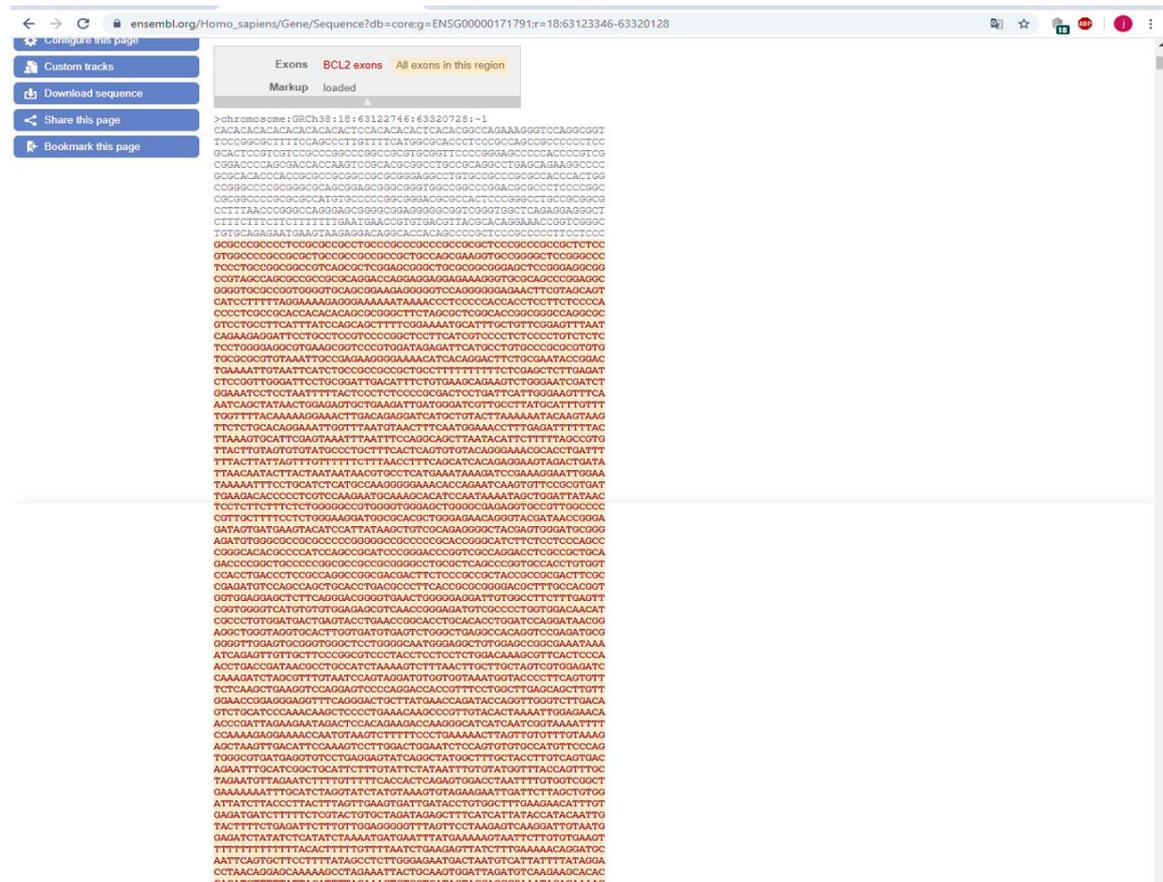


Figure 2.2. La séquence du gène *BCL-2* par la plateforme Ensembl

Afin de faciliter la recherche des amorces spécifiques de ce gène. Une séquence du gène *BCL-2* qui comporte les introns et les exons a été copiée et collée dans un document Word. Dans ce travail, nous avons choisi la séquence comportant l'exon 4 (la séquence encadrée dans le document Word) (Fig 2.3).

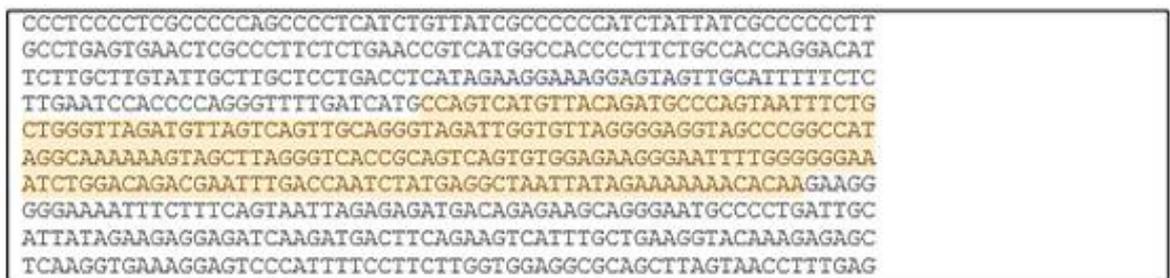


Figure 2.3. La séquence de l'exon 4 du gène *BCL-2*

### 2.2. L'outil Primer-Blast

A l'aide de National Center for Biotechnology Information (NCBI), nous avons utilisé l'outil Primer-Blast dans le site « [www.ncbi.nlm.nih](http://www.ncbi.nlm.nih) » pour la conception des amorces spécifique du gène *BCL-2* (Fig 2.4) (Ye et al., 2012).

## Chapitre 2. Matériel et méthodes

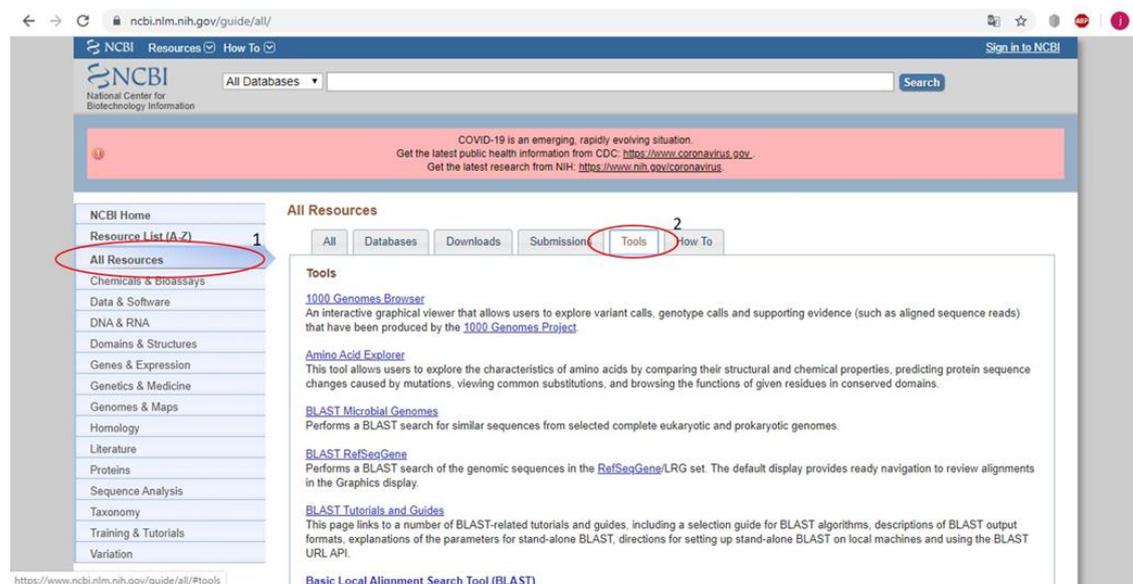


Figure 2.4. Le site NCBI

Les étapes de la conception des amorces spécifiques du gène *BCL-2* en utilisant l'outil Primer-Blast sont présentées dans les figures 2.5 et 2.6.

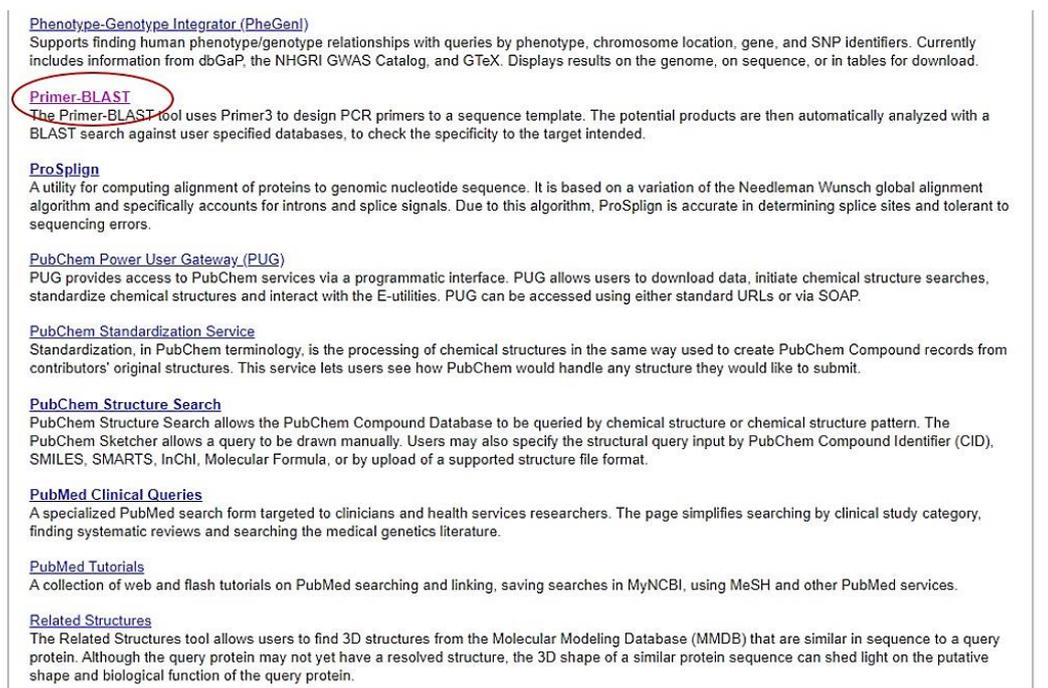


Figure 2.5. L'outil Primer-Blast

## Chapitre 2. Matériel et méthodes

Figure 2.6. Analyse de la séquence d'intérêt par le Primer-Blast.

Les amorces choisies doivent répondre aux critères cités en haut.

### 3. Confirmation des résultats par *in-Silico* PCR

La spécificité de la paire d'amorce choisi du gène *BCL-2* va être confirmée par le site *in-Silico* PCR.

Figure 2.7. Le site *in-Silico* PCR

## Chapitre 3. Résultats

### Chapitre 3. Résultats

#### 1. Résultats de Primer-Blast

Afin de concevoir nos amorces spécifiques du gène *BCL-2*, nous avons utilisé dans un premier temps le site Ensembl pour avoir l'intégrité du gène *BCL-2*. Ce dernier est composé de 6 exons. Dans cette étude, le quatrième exon a été choisi pour sa taille idéale pour le site Primer. Ensuite, nous avons utilisé l'outil Primer-Blast sur la base de données NCBI. Cette dernière, nous a permis d'avoir 10 paires d'amorces propres au gène *BCL-2* de l'exon 4.



Figure 3.1. Résultats de l'outil Primer-Blast

Parmi les paires d'amorces présentées dans la figure ci-dessus, nous avons choisi la seconde paire d'amorces pour les raisons suivantes :

## Chapitre 3. Résultats

- La première paire d'amorces n'a pas été choisie parce qu'elle contient quelques produits aspécifiques dont leur taille est inférieure à 1000 paires de bases.
- La taille de notre paire d'amorces choisie est de 519 paires de bases (**Fig 3.2**). Cette taille est comprise entre 250 à 900 paires bases. Le respect de ce critère est important à fin d'éviter le phénomène de saturation. En effet, plus la taille de l'amorce est supérieure à 1000 paires de bases, plus l'amorce devient difficile à amplifier.
- Pour de meilleurs résultats d'hybridation, l'amorce a besoin d'une température entre 55°C à 72°C (cette température correspond à une longueur de l'amorce de 18-24 bases). Notre paire répond parfaitement à ce critère car sa température correspond 59°C (**Fig 3.2**).
- La longueur des amorces est proportionnelle à l'efficacité de l'hybridation. De plus, la température d'hybridation doit être optimale pour une longueur d'amorce entre 18 à 24 bases. Dans ce contexte, nous avons choisi la paire d'amorces dont la taille est de 20 nucléotides (**Fig 3.2**). Plus l'amorce est longue, moins l'hybridation est efficace.
- Enfin, La teneur en GC est de 55% pour l'amorce du brin sens et anti-sens choisi. Ce pourcentage est compris entre 40 et 60%.

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 3.1.

Primer pair 2		Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer		GCCCTTCTCTGAACCGTCAT	Plus	20	75	94	59.75	55.00	3.00	2.00
Reverse primer		GTTACTAAGCTGCGCCTCCA	Minus	20	593	574	60.11	55.00	5.00	0.00
Product length		519								

Products on potentially unintended templates

>NC\_000018.10 Homo sapiens chromosome 18, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 519  
Features associated with this product:  
[apoptosis regulator Bcl-2 isoform alpha](#)

Forward primer 1 GCCCTTCTCTGAACCGTCAT 20  
Template 63151454 ..... 63151435

Reverse primer 1 GTTACTAAGCTGCGCCTCCA 20  
Template 63150936 ..... 63150955

>NC\_000015.10 Homo sapiens chromosome 15, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 2326  
Features associated with this product:  
[GRAM domain-containing protein 2A isoform X6](#)

[GRAM domain-containing protein 2A](#)

Forward primer 1 GCCCTTCTCTGAACCGTCAT 20  
Template 72169916 CAG.....A...C. 72169897

Reverse primer 1 GTTACTAAGCTGCGCCTCCA 20  
Template 72167591 .CCT.G.....A.... 72167610

>NC\_000021.9 Homo sapiens chromosome 21, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 3448  
Features flanking this product:  
[567324 bp at 5' side: neural cell adhesion molecule 2 isoform X7](#)  
[3476979 bp at 3' side: 39S ribosomal protein L39, mitochondrial isoform a](#)

Forward primer 1 GCCCTTCTCTGAACCGTCAT 20  
Template 22185280 TAA.....G..T.... 22185299

Reverse primer 1 GTTACTAAGCTGCGCCTCCA 20  
Template 22188727 ...GAC..A..... 22188788

Figure 3.2. Caractéristiques de la paire d'amorce choisie

## Chapitre 3. Résultats

### 2. Résultats d'*in-Silico* PCR

La paire d'amorce choisie a subi une confirmation par une *In-Silico* PCR en utilisant le site <http://genome.ucsc.edu/>. Le résultat de la confirmation obtenu (Fig 3.2) nous montre que nos amorces se localisent sur le chromosome 18, ce qui a confirmé la spécificité de ses amorces du gène *BCL-2*.

The screenshot displays the UCSC In-Silico PCR tool interface. At the top, there are navigation links: Genomes, Genome Browser, Tools, Mirrors, Downloads, My Data, Projects, Help, and About Us. The main section is titled "UCSC In-Silico PCR" and contains the following fields:

- Genome: Human (dropdown)
- Assembly: Dec. 2013 (GRCh38/hg38) (dropdown)
- Target: genome assembly (dropdown)
- Forward Primer: GCCCTTCTGTGAACCGTCAT (text input, circled in red)
- Reverse Primer: GTTACTAAGCTGCGCTCCA (text input, circled in red)
- submit (button)
- Max Product Size: 4000 (text input)
- Min Perfect Match: 15 (text input)
- Min Good Match: 15 (text input)
- Flip Reverse Primer:

Below the search fields is an "About In-Silico PCR" section with a brief description and a link to a video. The "Configuration Options" section lists several parameters and their definitions:

- 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.

The search results section shows the following information:

- chr18:3150926-63151454 519bp GCCCTTCTGTGAACCGTCAT GTTACTAAGCTGCGCTCCA
- A block of DNA sequence with the forward primer (GCCCTTCTGTGAACCGTCAT) and reverse primer (GTTACTAAGCTGCGCTCCA) highlighted in red.

Below the sequence is the "Primer Melting Temperatures" section:

- Forward: 61.6 C gcccttctgtgaaccgctcat
- Reverse: 60.5 C gttactaagctgctcca
- The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration. The code to calculate the melting temp comes from [Primer3](#)

Finally, there is a "Help" section with two links: "What is chr\_alt & chr\_fix?" and "Replicating in-Silico PCR results on local machine".

Figure 3.2. Résultats d'*in-Silico* PCR.

## Chapitre 4. Conclusions et perspectives

### Chapitre 4. Conclusions et perspectives

Le cancer est devenu un problème majeur dans la santé publique. Le nombre de personnes atteints est en perpétuelle augmentation. L'OMS estime que le nombre de cancéreux atteindra 15 millions de cas d'ici 2020.

Le cancer est synonyme de division anarchique ou incontrôlée des cellules somatiques qui lorsqu'il atteint différents organes, il devient une métastase. La maladie se développe suite à une activation des oncogènes et à l'inactivation du processus d'apoptose qui est contrôlé par le gène *BCL-2*. Ce dernier assure la régulation cellulaire entre les différents membres de protéines de la famille BCL-2, qui se situent sur la membrane externe de la mitochondrie.

Au cours de ses dernières années, l'étude de l'expression de ce gène pourrait offrir de nouvelles alternatives dans la thérapie anti-cancéreuse. Cette étude nécessite la réalisation d'une PCR afin d'amplifier le gène *BCL-2*.

Dans cette étude, nous avons conçus des amorces, en utilisant l'outil bio-informatique, afin de réaliser ultérieurement une PCR et amplifier le gène *BCL-2*. Cette étape est très importante dans la compréhension du devenir de cancer et la recherche des thérapies anti-cancéreuses. La paire d'amorce choisie a répondu à tous les critères de choix de bonnes d'amorces. Bien que ce résultat ait été confirmé par une PCR virtuelle, la réalisation d'*in vitro* PCR est fortement recommandée.

## Chapitre 5. Références bibliographiques

### Chapitre 5. Références bibliographiques

#### A

Anilkumar, U., and Prehn, J.H.M. (2014). Anti-apoptotic BCL-2 family proteins in acute neural injury. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 281.

Ashkenazi, A., Fairbrother, W.J., Levenson, J.D., and Souers, A.J. (2017). From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 273–284.

#### B

Benz, E.J. (2017). The Jeremiah Metzger Lecture Cancer in the Twenty-First Century: An Inside View from an Outsider. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 128, 275–297.

Birkinshaw, R.W., and Czabotar, P.E. (2017). The BCL-2 family of proteins and mitochondrial outer membrane permeabilisation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 72, 152–162.

Blackadar, C.B. (2016). Historical review of the causes of cancer. *World J. Clin. Oncol.* 7, 54–86.

#### C

Chan, D.C. (2006). Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 79–99.

Clapp, R.W., Jacobs, M.M., and Loechler, E.L. (2008). Environmental and occupational causes of cancer: new evidence 2005-2007. *Rev. Environ. Health* 23, 1–37.

Coultas, L., and Strasser, A. (2003). The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Semin. Cancer Biol.* 13, 115–123.

#### D

Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004a). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21, 137–148.

Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004b). The three Es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 329–360.

#### F

Ferrara, F., Bradbury, A.R.M., and D'Angelo, S. (2018). Primer Design and Inverse PCR on Yeast Display Antibody Selection Outputs. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1721, 35–45.

Flores-Romero, H., and García-Sáez, A.J. (2019). The Incomplete Puzzle of the BCL2 Proteins. *Cells* 8.

Fouad, Y.A., and Aanei, C. (2017). Revisiting the hallmarks of cancer. *Am. J. Cancer Res.* 7, 1016–1036.

## Chapitre 5. Références bibliographiques

Frenzel, A., Grespi, F., Chmielewski, W., and Villunger, A. (2009). Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 14, 584–596.

### G

Gariyban, L., and Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *J. Invest. Dermatol.* 133, 1–4.

Glaser, P. (2005). Les puces à ADN vont-elles révolutionner l'identification des bactéries ? *Médecine/Sciences* 21, 539–544.

Gonzalez, H., Hagerling, C., and Werb, Z. (2018). Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev.* 32, 1267–1284.

### H

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.

Happo, L., Strasser, A., and Cory, S. (2012). BH3-only proteins in apoptosis at a glance. *J. Cell Sci.* 125, 1081–1087.

Hardwick, J.M., and Soane, L. (2013). Multiple functions of BCL-2 family proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5.

Higgins, M., Ravenhall, M., Ward, D., Phelan, J., Ibrahim, A., Forrest, M.S., Clark, T.G., and Campino, S. (2019). PrimedRPA: primer design for recombinase polymerase amplification assays. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 35, 682–684.

### J

Jane Gurr, S. (1991). PCR Protocols-A Guide to Methods and Applications. *Biochem. Educ.* 19, 45.

Jemal, A., Ward, E., and Thun, M.J. (2007). Recent trends in breast cancer incidence rates by age and tumor characteristics among U.S. women. *Breast Cancer Res. BCR* 9, R28.

Jeong, S.-Y., and Seol, D.-W. (2008). The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep.* 41, 11–22.

Jiang, W., Yue, S., He, S., Chen, C., Liu, S., Jiang, H., Tong, H., Liu, X., Wang, J., Zhang, F., et al. (2018). New design of probe and central-homo primer pairs to improve TaqMan™ PCR accuracy for HBV detection. *J. Virol. Methods* 254, 25–30.

### K

Kim, R., Emi, M., and Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 121, 1–14.

### L

Lorenz, T.C. (2012). Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J. Vis. Exp. JoVE* e3998.

## Chapitre 5. Références bibliographiques

### M

Mackay, I.M. (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 30, 1292–1305.

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.

McBride, H.M., Neuspiel, M., and Wasiaak, S. (2006). Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr. Biol. CB* 16, R551-560.

Mittal, D., Gubin, M.M., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr. Opin. Immunol.* 27, 16–25.

### O

Opferman, J.T., and Kothari, A. (2018a). Anti-apoptotic BCL-2 family members in development. *Cell Death Differ.* 25, 37–45.

Opferman, J.T., and Kothari, A. (2018b). Anti-apoptotic BCL-2 family members in development. *Cell Death Differ.* 25, 37–45.

### P

Pandya, P.H., Murray, M.E., Pollok, K.E., and Renbarger, J.L. (2016). The Immune System in Cancer Pathogenesis: Potential Therapeutic Approaches. *J. Immunol. Res.* 2016, 4273943.

Papavramidou, N., Papavramidis, T., and Demetriou, T. (2010). Ancient Greek and Greco-Roman methods in modern surgical treatment of cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 17, 665–667.

Petros, A.M., Olejniczak, E.T., and Fesik, S.W. (2004). Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1644, 83–94.

### R

Romero-Garcia, S., Lopez-Gonzalez, J.S., Báez-Viveros, J.L., Aguilar-Cazares, D., and Prado-Garcia, H. (2011). Tumor cell metabolism: an integral view. *Cancer Biol. Ther.* 12, 939–948.

### S

Schreiber, R.D., Old, L.J., and Smyth, M.J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331, 1565–1570.

Shamas-Din, A., Kale, J., Leber, B., and Andrews, D.W. (2013). Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a008714.

Starks, B.W., Corstvet, R.E., and Buckner, R.G. (1976). Certain characteristics of the infective agent of feline infectious peritonitis. *Am. J. Vet. Res.* 37, 335–338.

Straten, P. thor, and Andersen, M.H. (2010). The anti-apoptotic members of the Bcl-2 family are attractive tumor-associated antigens. *Oncotarget* 1, 239–245.

## Chapitre 5. Références bibliographiques

Sun, W., Winseck, A., Vinsant, S., Park, O., Kim, H., and Oppenheim, R.W. (2004). Programmed cell death of adult-generated hippocampal neurons is mediated by the proapoptotic gene Bax. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 11205–11213.

### T

Tubiana, M. (2008). Généralités sur la cancérogenèse. *C. R. Biol.* *331*, 114–125.

Tzifi, F., Economopoulou, C., Gourgiotis, D., Ardavanis, A., Papageorgiou, S., and Scorilas, A. (2012). The Role of BCL2 Family of Apoptosis Regulator Proteins in Acute and Chronic Leukemias. *Adv. Hematol.* *2012*, 524308.

### V

Valones, M.A.A., Guimarães, R.L., Brandão, L.A.C., de Souza, P.R.E., de Albuquerque Tavares Carvalho, A., and Crovela, S. (2009). Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Braz. J. Microbiol. Publ. Braz. Soc. Microbiol.* *40*, 1–11.

Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu. Rev. Immunol.* *29*, 235–271.

Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* *10*, 789–799.

### W

Wu, X., Peng, M., Huang, B., Zhang, H., Wang, H., Huang, B., Xue, Z., Zhang, L., Da, Y., Yang, D., et al. (2013). Immune microenvironment profiles of tumor immune equilibrium and immune escape states of mouse sarcoma. *Cancer Lett.* *340*, 124–133.

### Y

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., and Madden, T.L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* *13*, 134.

### Z

Zheng, T.S., Hunot, S., Kuida, K., Momoi, T., Srinivasan, A., Nicholson, D.W., Lazebnik, Y., and Flavell, R.A. (2000). Deficiency in caspase-9 or caspase-3 induces compensatory caspase activation. *Nat. Med.* *6*, 1241–1247.

## Résumé

**Introduction :** Le cancer est l'une des causes majeures de décès dans le monde. L'immunité anti-tumorale joue un rôle important dans la défense de l'organisme contre les tumeurs, et est également responsable du contrôle de la majorité des tumeurs. Le gène *BCL-2* est responsable de l'apoptose cellulaire qui est supposée avoir un effet anti-tumoral.

**Objectif :** L'objectif de ce travail consiste à concevoir des amorces spécifiques au gène *BCL-2* associé à l'immunité anti-tumorale.

**Matériels et méthodes :** La conception des amorces pour le gène *BCL-2* a été effectuée en utilisant l'outil Primer-Blast du site « [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov) ».

**Résultats :** A cause des produits aspécifiques supérieurs à 1000 paires de bases, la seconde paire des amorces a été choisie. Cette paire répond également à tous les critères des bonnes amorces.

**Conclusion :** la paire des amorces choisie servira à amplifier par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) le gène *BCL-2* afin d'étudier son rôle dans l'immunité anti-tumorale.

**Mots clés :** Cancer, Gène *BCL-2*, PCR, Amorces.

## Abstract

**Introduction:** Cancer is one of the leading causes of death in the world. Anti-tumor immunity plays an important role in the body's defense against tumors, and is also responsible for the control of the majority of tumors. The *BCL-2* gene is responsible for cell apoptosis that is supposed to have an anti-tumor effect.

**Objective:** The aim of this study is to design primers specific to the *BCL-2* gene associated with anti-tumor immunity.

**Materials and methods:** The design of primers for the gene *BCL-2* was performed using the Primer-Blast tool from the Site "[www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)".

**Results:** Because of the nonspecific products greater than 1000 base pairs, the second pair of primers was chosen. This pair also meets all the criteria for good primers.

**Conclusion:** the selected pair of primers will be used to amplify by polymerase chain reaction (PCR) the *BCL-2* gene in order to study its role in antitumor immunity.

**Keywords:** Cancer, *BCL-2* gene, PCR; Primers.

## ملخص

**مقدمة:** السرطان هو أحد الأسباب الرئيسية للوفاة في العالم. تلعب المناعة المضادة للأورام دورًا مهمًا في الدفاع عن الجسم ضد الأورام، كما أنها مسؤولة عن السيطرة على غالبيتها. الجين *BCL-2* مسؤول عن موت الخلايا المبرمج الذي يعتقد أنه له تأثير مضاد للورم.

**الهدف:** من هذا العمل هو تصميم برايمر خاص بجين *BCL-2* المرتبط بمناعة المناعة ضد الأورام.

**المواد والأساليب:** تم تصميم البرايمز خاص بجين *BCL-2* باستعمال الاداة primer-Blast من الموقع « [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov) ».

**النتائج:** بسبب المنتجات غير النوعية التي تزيد عن 1000 زوج أساسي، تم اختيار الزوج الثاني من البرايمر. وفي هذا الزوج أيضًا بجميع معايير البرايمر الجيدة.

**الخلاصة:** سيتم استخدام الزوج المختار لتضخيم الجين *BCL-2* بواسطة تفاعل سلسلة بوليميراز (PCR) من أجل دراسة دوره في مناعة مضادة للأورام.

**الكلمات المفتاحية:** السرطان، جين *BCL-2*، PCR، البرايمر.