

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

UNIVERSITÉ 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

MÉMOIRE

Présenté par

RAHMOUN Batoul

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Immunologie

Thème

Conception des amorces du gène *Bax* associé à l'immunité anti-tumorale

Soutenu le 21 Septembre 2020, devant le jury composé de :

Présidente	MILIANI Marwa	MAB	Université de Tlemcen
Encadrante	NOUARI Wafa	MCB	Université de Tlemcen
Examinatrice	BRAHAMI Nabila	MCA	Université de Tlemcen

Année universitaire 2019/2020

Résumé**Introduction**

Le cancer est une maladie qui se caractérise par une prolifération cellulaire anarchique, une perte de la différenciation et une absence de la mort cellulaire. *Bax* est un gène qui code la protéine Bax appartenant à la famille des protéines BCL2. Il est impliqué dans la régulation de la mort cellulaire apoptotique et est fréquemment muté dans le cancer humain.

Objectif : Concevoir des amorces du gène *Bax* exprimé au cours de la maladie du cancer.

Matériels et méthodes : La conception de bonnes amorces passe par plusieurs étapes.

D'abord, la séquence du gène *Bax* a été prise à partir du site web ENSEMBL. Ensuite, à travers le centre national de l'information biotechnologique (NCBI) et par l'utilisation de l'outil Primer blaste, les amorces spécifiques du gène *Bax* ont été conçues. Enfin, la paire d'amorces choisie répondant aux critères de choix de bonnes amorces a été vérifié par *in silico*-PCR.

Résultats : Parmi les 10 paires d'amorces spécifiques du gène *Bax* obtenues, nous avons choisi la première paire répondant aux critères désirés.

Conclusion : Concevoir une bonne amorce est nécessaire à la réussite de la technique PCR et par conséquent permet l'amplification correcte du gène *Bax* et l'étude de son rôle dans l'immunité antitumorale.

Mots clés : cancer, *Bax*, apoptose, amorce.

Abstract**Introduction**

Cancer is a disease characterized by uncontrolled cell proliferation, loss of differentiation and absence of cell death. *Bax* is a gene, which encodes the Bax protein belonging to the BCL2 protein family, it is involved in the regulation of apoptotic cell death and is frequently mutated in human cancer.

Objective: Design primers for the *Bax* gene expressed in cancer disease.

Materials and methods: There are several steps to designing good primers. First, the sequence for the *Bax* gene was taken from the ENSEMBLE site. Then, through the national center for biotechnological information (NCBI) and by using the Primer blaste tool, the primers specific to the *Bax* gene were designed. choice of good primers was verified by *in silico*-PCR.

Results: Among the 10 pairs of primers specific for the *Bax* gene obtained, we chose the first pair of primers, because it meets the criteria for good primers.

Conclusion: Designing a good primer helps the PCR technique to succeed, and therefore the correct amplification of the *Bax* gene and the study of its role in cancer.

Keywords : Cancer, *Bax*, apoptosis, primer.

ملخص

المقدمة: السرطان مرض يتميز بتكاثر الخلايا غير المنضبط وفقدان التمايز وغياب موت الخلايا. *Bax* هو جين يقوم بترميز بروتين *Bax* الذي ينتمي إلى عائلة *BCL2* من البروتينات ، وهو يشارك في تنظيم موت الخلايا المبرمج وغالبًا ما يتطور في سرطان الإنسان. يتضمن هذا العمل تصميم البرايمرز الخاصة بجين *Bax* والتي سيتم استخدامها للنسخ الفعال والأمثل بواسطة PCR.

الهدف: تصميم زوج من البرايمرز لجين *Bax* في مرض السرطان.

المواد والطرق: هناك عدة خطوات لتصميم بادئات جيدة.

أولاً، تم أخذ تسلسل جين *Bax* من موقع ENSEMBL. بعد ذلك، من خلال المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI) ومن خلال استخدام أداة Primer-BLAST، تم تصميم البرايمرز الخاصة بجين *Bax*. أخيراً، تم التحقق من زوج البرايمرز المختارة والذي يلبي معايير اختيار البرايمر الجيدة في *in-silico* PCR.

النتائج: من بين 10 أزواج من البرايمرز الخاصة بجين *Bax* التي تم الحصول عليها، اخترنا أول زوج من البرايمرز ، لأنه يفي بمعايير البرايمرز الجيدة.

الخلاصة: يساعد تصميم برايمر جيد على نجاح تقنية PCR وبالتالي التضخيم الصحيح لجين *Bax* ودراسة دوره ضد السرطان.

كلمات البحث: موت الخلايا المبرمج، *BAX*، السرطان، البرايمرز.

Avant-propos

En tout premier lieu, je remercie Allah, le tout puissant, de m'avoir donné la force pour dépasser toutes les difficultés et accomplir ce travail.

Je me ferais un agréable devoir de remerciement au Professeur Mourad ARIBI le directeur du laboratoire BIOMOLIM, Biologie Moléculaire Appliqué et d'Immunologie (Université de Tlemcen) qui m'a accueilli dans son Laboratoire.

Ma plus grande gratitude va à mon encadrante Dr. Wafa NAOUARI pour sa disponibilité, sa compréhension, son soutien et la confiance qu'elle m'a accordée. J'aimerais aussi la remercier pour ses précieux conseils qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

Je tiens à remercier les membres du jury Dr BRAHAMI N et Dr MILIANI M d'avoir prises part à l'évaluation de ce travail.

Je remercie également toutes l'équipe du Laboratoire Biomolim.

Je dédie ce modeste travail en signe de respect, reconnaissance et de remerciements

À mes chers parents qui m'ont aidé de près et de loin.

À mon mari Adhem

À mes chers sœurs et frère, Imane, Asmaa et Omar

À mes nièces et neveux

À mes beaux-parents et mes belles sœurs.

À toute ma belle famille

À toutes mes chers amies Hanane B, Inès, Sarra, Yasmine, Amel, Hanane S....

À tous mes collègues

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
Résumé en arabe	v
Avant-propos	vi
Table des matières	vii
Liste des figures	ix
Liste d'abréviations	x
Introduction	1
CHAPITRE 1. REVUE DE LA LITTÉRATURE	3
1.1. Cancer	3
1.1.1. Généralités	3
1.1.2. Anomalies et altérations génétiques	3
1.1.2.1. Les oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs	3
1.1.3. Caractéristiques de la cellule maligne	3
1.1.3.1. Signalisation proliférative soutenue	4
1.1.3.2. Insensibilité aux signaux anti-prolifératifs	4
1.1.3.3. La résistance à la mort cellulaire	4
1.1.3.4. Capacité à induire l'angiogenèse	4
1.1.3.5. Immortalité réplivative	4
1.1.3.6. Activation d'un processus d'invasion et de dissémination métastatique	5
1.1.4. Cancérogénèse	5
1.1.4.1. Initiation	6
1.1.4.2. Promotion	6
1.1.4.3. Progression	6
1.1.3. Réponse immunitaire anti-tumorale	6
1.1.3.1. Immunosurveillance	6
1.1.3.2. L'immunoediting	7
1.2. La mort cellulaire apoptotique	7
1.2.1. Définition	7
1.2.2. La voie extrinsèque	8
1.2.3. La voie intrinsèque	8
1.3. La famille Bcl-2	9
1.3.1. Définition	9
1.3.2. Classification des membres de la famille Bcl-2	9

Table des matières	IIV
1.4.1. Définition	10
1.4.2. Structure de la protéine <i>Bax</i>	10
1.4.3. Voie d'activation	13
1.4.3.1. Le modèle d'activation directe	13
1.4.3.2. Le modèle de déplacement	13
1.4.3.3. Le modèle unifié	13
1.4.4. Fonction et signalisation	14
1.5. Technique de la PCR	16
1.5.1. Principe de la PCR	16
1.5.2. Applications de la PCR	17
1.5.3. Étapes de la PCR	17
1.5.4. Acteurs de la PCR	17
1.6. Problématiques et Objectifs	18
1.6.1. Problématique	18
1.6.2. Objectif	18
1.6.3. But	18
CHAPITRE 2. MATERIELS ET METHODES	19
2.1. Conception des amorces	19
2.2. Séquence du gène <i>Bax</i>	19
2.3. L'outil de Primer BLAST	21
2.4. PCR <i>in-silico</i>	23
CHAPITRE 3. RÉSULTATS	24
3.1. Résultats de Primer BLAST	24
3.2. Confirmation des résultats	25
CHAPITRE 4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	26
CHAPITRE 5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	27

Liste des figures

Figure 1.1.	Les caractéristiques des cellules cancéreuses.	5
Figure 1.2.	Classification des membres de la famille Bcl2.	10
Figure 1.3.	Gène BAX en localisation génomique : bandes selon Ensembl,11 localisations selon GeneLoc.	11
Figure 1.4.	Structure de <i>Bax</i> .	12
Figure 1.5.	Différents modèles de perméabilisation de la membrane externe14 mitochondriale médiée par l'activation Bax (MOMP).	14
Figure 1.6.	Processus apoptotique intrinsèque par la famille Bcl-2 et extrinsèque via les récepteurs de mort.	16
Figure 2.1.	Base de données ENSEMBL.	20
Figure 2.2.	La séquence encadrée du gène <i>Bax</i> .	20
Figure 2.3.	La base des données NCBI.	21
Figure 2.4.	L'outil primer blast.	21
Figure 2.5.	Analyse de séquence d'intérêt par Primer blast.	22
Figure 2.6.	Les caractéristiques sélectionnées.	22
Figure 2.7.	Le logiciel <i>in-silico</i> PCR.	23
Figure 2.8.	Résultats du Primer BLAST.	24
Figure 2.9.	Confirmation des résultats par le logiciel <i>in-silico</i> PCR.	25

Liste des abréviations

A

- ADN :** Acide désoxyribonucléique
Apaf-1 : Apoptotic peptidase activating factor 1
ATP : Adénosine-Triphosphate

B

- Bax :** Bcl-2 Associated X-protein

C

- Ca⁺ :** Calcium
CD4 : Cluster de différenciation 4
CD8 : Cluster de différenciation 8
CMH : Le complexe majeur d'histocompatibilité
Cys : Acide aminé La cystéine

D

- DIABLO :** Diablo homolog

F

- FasR :** La famille des récepteurs Fas

H

- Ha :** Hélice α

I

- IL-2 :** Interleukine-2

L

- Leu :** Acide aminé L'isoleucine
LT : Lymphocytes T

MOMP : La perméabilisation de la membrane externe mitochondriale

N

NK : Natural Killer

P

PCR : Polymérase Chain Reaction

Prb : Protéine du rétinoblastome

PT : Transition de perméabilité

S

Ser : Acide aminé sérine

SMAC : Complexe supramoléculaire d'adhésion

T

TGF β : Récepteurs du facteur de croissance transformant bêta

Thr : Acide aminé La thréonine

Tm : Température de Fusion

TNF : Facteur de nécrose tumorale

V

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

Introduction générale

Le cancer demeure la cause principale de mortalité dans le monde. Il s'agit d'une maladie qui peut toucher n'importe quelle partie de l'organisme. Tout commence par une accumulation des mutations et une altération génétique avec un système de réparation d'ADN dysfonctionnel (Vogelstein et Kinzler, 2004). Par conséquent, les cellules normales acquièrent de nouvelles propriétés phénotypiques. Une résistance à l'apoptose en plus d'une prolifération anarchique et excessive débutera et puis ces cellules suivront un processus en plusieurs étapes avec généralement une évolution vers des cellules précancéreuses et puis vers une tumeur.

En 2002, Dunn Schreiber a mis en évidence le concept, comprenant trois phases, d'«immuno-édition du cancer » appelée également Théorie des 3 E (élimination, équilibre et échappement). Cette théorie postule que le système immunitaire interagit avec la tumeur tout au long de son développement et influence sa croissance (Dunn et al., 2004).

Le développement cancéreux est provoqué par plusieurs processus notamment l'inhibition de la mort cellulaire programmée qu'on nomme par le terme apoptose. C'est un programme génétiquement codé provoquant une autodestruction de la cellule. L'apoptose sert à l'élimination des cellules interdigitales et des neurones en excès et participe à l'éducation thymique des lymphocytes T par élimination des cellules T auto-réactives (Punt et al., 1994 ;Zakeri et al., 1994). Elle doit être en équilibre constant avec la prolifération cellulaire pour le développement et le maintien général de l'organisme.

Il existe deux voies principales d'induction de l'apoptose : la voie extrinsèque (ou voie des récepteurs de mort) et la voie intrinsèque (ou voie mitochondriale) qui, quant à elle, est régulée par la famille de protéines Bcl-2 (Carpenter & Brady, 2020). La famille Bcl-2 est un ensemble de protéines qui permettent le contrôle du déclenchement d'une réponse apoptotique. Elle est classée en deux groupes, les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-x L, Bcl-w, Mcl-1 et A1) et les protéines pro-apoptotiques. Les protéines pro-apoptotiques se divisent en deux groupes : les multi-domaines (Bax et Bak et bok) et les protéines pro-apoptotiques à BH3 uniquement (Bid, Bim, Puma, Bad, Noxa, Bik, Bmf et Hrk). Les protéines pro-apoptotiques multi-domaines *Bax* et *Bak* sont des protéines exécutives essentiellement responsables du dysfonctionnement mitochondrial ainsi que de la

Introduction générale

mort cellulaire (Wei et al.,2001).

Le gène *Bax* (Bcl-2 Associated X-protein) est un membre pro-apoptotique de la famille des gènes Bcl-2. Il code pour une protéine de 21 kDa nommé BAX-alpha, dont l'association avec Bcl-2 joue un rôle essentiel dans l'activation de *Bax* d'une manière directe, indirecte ou unifié selon les modèles d'activation de *Bax* et Bak via les protéines BH3-uniquement (BH3-only).

Une fois activée, *Bax* va être oligomérisée puis va inférer une perméabilisation dans la membrane mitochondriale. Ceci va engendrer une libération de protéines intra-mitochondrial comme le cytochrome ce qui conduit par la suite à l'activation des caspases et pour finalement induire la mort cellulaire apoptotique. Par ailleurs, on remarque que lors d'un développement tumoral, il y' a une dérégulation du fonctionnement de la voie de signalisation des protéines Bcl-2 (Liu et al., 2016)

Dans ce travail, je résume la compréhension actuelle des structures et des fonctions physiologiques de la protéine *Bax*. Tout cela dans un objectif de concevoir des amorces du gène *Bax* pour réaliser une PCR afin de mieux comprendre l'implication du *Bax* dans immunité antitumorale.

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.1. Cancer

1.1.1 Généralités

Le cancer est une maladie qui prend naissance dans nos cellules et peut affecter n'importe quelle partie de l'organisme. La cellule initiatrice du cancer subit une transformation par mutation et une instabilité génétique, épigénétique, ou moléculaire (Vogelstein et Kinzler, 2004), ce qui engendre une signalisation proliférative soutenue, des anomalies dans la réparation d'acide désoxyribonucléique (l'ADN) et une résistance à la mort cellulaire. Les nouvelles cellules qui résultent s'accumulent dans le tissu de l'organisme et forment une tumeur maligne ou un néoplasme. Certaines tumeurs envahissent des parties voisines de l'organisme et puis se multiplient dans d'autres organes. Il s'agit d'une métastase.

1.1.2 Anomalies et altérations génétiques

1.1.2.1 Les oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs

Les proto-oncogènes sont des gènes qui codent pour des protéines qui régulent la prolifération cellulaire normale. Cependant, les oncogènes sont la forme mutée des proto-oncogènes. Ils engendrent la prolifération anarchique des cellules cancéreuses, la différenciation défectueuse et l'incapacité à subir une mort cellulaire programmée (Cooper, 2000). À l'opposé, les gènes suppresseurs de tumeurs fonctionnent notamment pour inhiber la prolifération cellulaire, les voies de signalisation mitogènes, la progression du cycle cellulaire, les programmes «pro-croissance» du métabolisme ainsi que les métastases. Ces gènes suppresseurs de tumeurs assurent également la stabilisation du génome et la réparation de l'ADN. Si les dommages de l'ADN sont graves, ils provoquent la mort programmée de la cellule par apoptose (Joyce et Kasi, 2020). Toutefois, des mutations peuvent rendre ces suppresseurs de tumeurs inactifs, provoquant une prolifération rapide induisant ainsi un cancer.

1.1.3 Caractéristiques de la cellule maligne

La majorité des cancers sont la conséquence d'une succession d'altérations génétiques (Hanahan et Weinberg, 2011). Les auteurs Hanahan et Weinberg ont décrit les propriétés phénotypiques majeures de la cellule cancéreuse quels que soient le type de cancer et les gènes mutés. Ils ont mis en évidence six caractéristiques (**Fig 1.1**) (D. Hanahan et Weinberg, 2000).

1.1.3.1 Signalisation proliférative soutenue

Les cellules tumorales développent différentes méthodes pour maintenir une prolifération soutenue. La cellule produit les facteurs de croissance dont elle a besoin pour proliférer d'une manière autocrine (Walsh et al., 1991), ce qui cause une surexpression de récepteurs aux facteurs de croissance et une activation continue des voies de signalisation en aval ces récepteurs même en absence d'une stimulation mitogénique (Davies et al., 2002).

1.1.3.2 Insensibilité aux signaux anti-prolifératifs

Il s'agit d'une inactivation des gènes suppresseurs de la tumeurs comme la protéine La protéine du rétinoblastome(pRb) et p53 en agissant sur leurs récepteurs du facteur de croissance transformant bêta (TGF β) ce qui dérégule le cycle cellulaire (Markowitz et al., 1995).

1.1.3.3 La résistance à la mort cellulaire

Parmi les stratégies qui sont utilisées par la cellule maligne pour résister à l'apoptose, on retrouve la perte de fonction de la protéine P53 ce qui engendre la surexpression des protéines anti-apoptotiques ou la diminution de l'expression des protéines pro-apoptotiques comme la protéine Bcl-2 Associated X-protein (Bax) (Gong et al., 2013).

1.1.3.4 Capacité à induire l'angiogénèse

L'angiogénèse permet la formation des vaisseaux sanguins qui alimentent la tumeur en oxygène et en nutriments pour assurer sa croissance. Les tumeurs sont capables de produire le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) ce qui leur permet d'activer leur propre angiogénèse (D. Hanahan & Folkman, 1996).

1.1.3.5 Immortalité répllicative

Une grande majorité des cellules présentent un nombre de divisions limité portant le nom de son découvreur : « la limite de Hayflick » (Hayflick & Moorhead, 1961). Pour empêcher cette limite, les cellules cancéreuses expriment la télomérase dont la fonction est d'ajouter des segments de télomères à l'extrémité des chromosomes conduisant à un potentiel réplcatif illimité et à un processus d'immortalisation qui est nécessaire à la formation des tumeurs (Bryan & Cech, 1999).

1.1.3.6 Activation d'un processus d'invasion et de dissémination métastatique

La dissémination métastatique est la principale cause de mortalité liée aux cancers. L'évènement de la dissémination d'une cellule cancéreuse commence par la perte d'attachement entre elles (Hotz et al., 2007; Rhim et al., 2012). Cette cellule détachée migre vers la partie trans-endothéliale pour entrer ensuite dans le compartiment sanguin (intravasation) puis en sortir (extravasation) et ainsi engendrer une micro-métastase.

Hanahan et Weinberg ont ajouté deux nouvelles caractéristiques phénotypiques partagées par les cellules cancéreuses dans une mise à jour de leur revue parue en 2011: la reprogrammation du métabolisme, et l'échappement au système immunitaire (Douglas Hanahan & Weinberg, 2011).

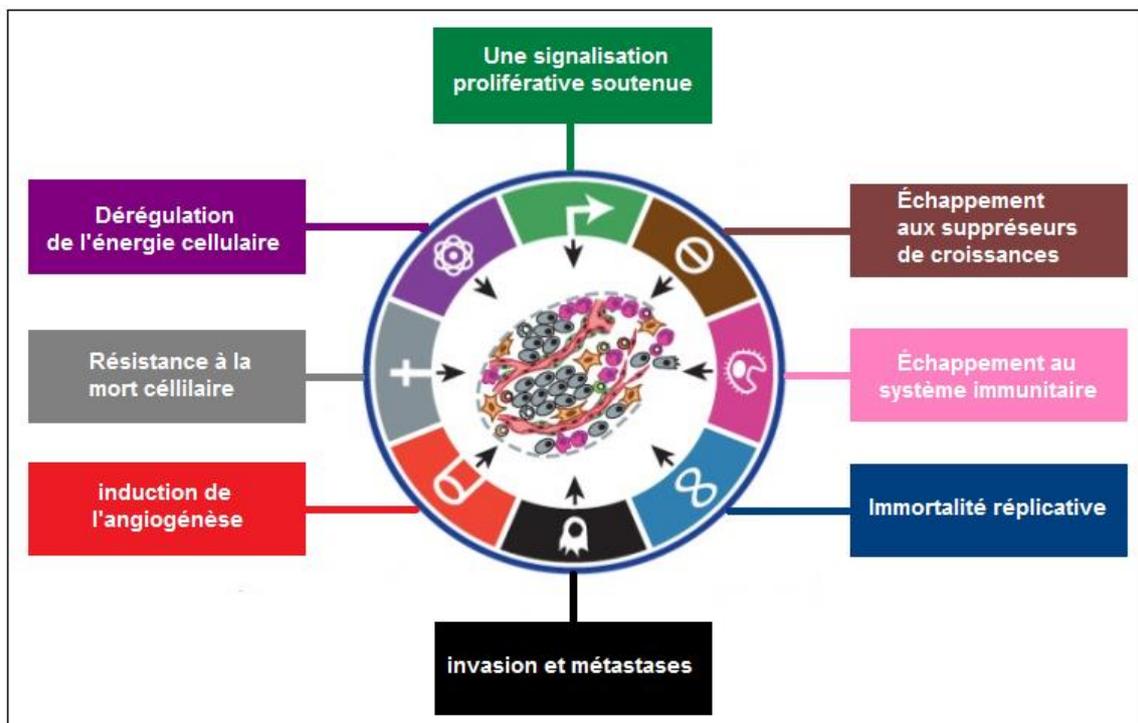


Figure 1.1. Les caractéristiques des cellules cancéreuses (Douglas Hanahan & Weinberg, 2011)

1.1.4 Cancérogénèse

Le développement d'un cancer est un processus à plusieurs étapes complexes : l'initiation, la promotion et la progression.

1.1.4.1 Initiation

Cette étape est caractérisée par l'apparition d'une mutation génétique irréversible provoquée par un agent carcinogène (agents chimiques, radiations...etc) qui engendre l'évolution maligne et l'immortalité des cellules (Berenblum & Shubik, 1947). Les gènes suppresseurs de tumeurs peuvent les faire échapper au devenir cancéreux soit en réparant l'ADN muté, en inhibant la prolifération ou finalement en déclenchant la mort cellulaire programmée. Ces gènes suppresseurs peuvent également être mutés ce qui les rend non fonctionnels. À ce moment-là, la cellule subit des anomalies de réparation de l'ADN ainsi qu'une multiplication cellulaire exagérée et anarchique et/ou une résistance à l'apoptose conduisant à la formation d'une cellule appelée « initiée » (Butterworth et al., 1992).

1.1.4.2 Promotion

Les cellules initiées vont proliférer en présence d'agents promoteurs tumoraux dont l'efficacité dépend de leur concentration dans le tissu cible (Butterworth et al., 1992). Finalement, des lésions précancéreuses vont être formées.

1.1.4.3 Progression

Les lésions qui surviennent pendant les deux phases précédentes sont définies comme des pré-néoplasiques. Ils se transformeront en lésions malignes durant la dernière étape de la cancérogenèse dite progression. Durant cette dernière, un phénotype néoplasique va être acquis par des mécanismes génétiques et épigénétiques (Shacter & Weitzman, 2002). Cette phase est caractérisée par une irréversibilité, une instabilité génétique, une croissance incontrôlée et un changement métabolique et morphologique des cellules (Pitot, 2001 ; Dixon & Kopras, 2004). Enfin, une dissémination métastatique est assurée par une intravasation de cellules tumorales décrites par leur survie dans la circulation sanguine ou lymphatique et une extravasation dans un tissu provoquant le développement d'une tumeur secondaire (Oliveira et al., 2007).

1.1.3 Réponse immunitaire anti-tumorale

1.1.3.1 Immunosurveillance

L'immunosurveillance est un concept qui a été élaboré par McFarlane Burnet et Lewis Thomas. Il s'agit de la capacité du système immunitaire à provoquer une réaction immunologique efficace contre les néo-antigènes spécifiques exprimés par les cellules tumorales (Burnet, 1970). Les cellules présentatrices d'antigènes traitent et présentent les antigènes associés aux tumeurs aux cellules immunitaires. Les antigènes tumoraux peuvent être reconnus par les lymphocytes T (LT), en coopération avec le complexe majeur

d'histocompatibilité (CMH) permettant aux cellules T d'interagir avec les cellules présentatrices d'antigènes (Boon & van der Bruggen, 1996). Dans différents types de tumeurs humaines, une survie plus longue a été observée chez les patients ayant un nombre élevé de lymphocytes et de cellules Natural Killer (NK). Ces dernières ne nécessitent pas de sensibilisation préalable pour une lyse efficace des cellules tumorales. En effet, après une simple activation avec l'interleukine-2 (IL-2), les cellules NK provoquent la mort des cellules tumorales (Waldhauer & Steinle, 2008).

1.1.3.2 L'immunoediting

Srivastava, spécialiste en immunologie, a dit : *«L'hypothèse de la surveillance immunitaire est souvent considérée comme le fondement intellectuel de l'immunologie du cancer. Bien que l'hypothèse elle-même ait peu contribué à nos tentatives de traitement du cancer par des moyens immunologiques, elle a de profondes implications pour la compréhension des fonctions du système immunitaire»*. De plus, Dunn Schreiber a mis en évidence le concept d'«immuno-édition du cancer», qui comprend 3 phases appelée théorie des 3 E. La première est la phase d'élimination pendant laquelle la majorité des cellules tumorales sont éliminées par les cellules NK et les cellules T CD4 + et CD8 + (Gasser & Raulet, 2006). La deuxième est la phase d'équilibre. Il s'agit d'un état d'équilibre entre les cellules immunitaires et les cellules tumorales ayant survécus. Cette phase est la plus longue et peut durer plusieurs années chez l'homme. Enfin, la troisième phase est la phase d'échappement où le système immunitaire est incapable d'éliminer la tumeur. Elle se termine par l'apparition des signes cliniques de la tumeur (Ribatti, 2017).

1.2 La mort cellulaire apoptotique

1.2.1 Définition

Étymologiquement, l'apoptose est un terme grec signifiant «chute en se détachant». Le mot est initialement utilisé par Kerr, Wyllie et Curie en 1972 pour être défini sur la base de critères morphologiques et pour distinguer la nécrose et la formation de structures cellulaires actuellement connues pour être des corps apoptotiques (Kerr et al., 1972). L'apoptose est un programme génétiquement codé provoquant une autodestruction de la cellule. Il intervient de manière essentielle à différents niveaux du développement de l'organisme dont par exemple celui du système nerveux et de la maturation des cellules lymphoïdes. D'un point de vue plus approfondi, l'apoptose sert à éliminer des cellules interdigitales et des neurones en excès et participe à l'éducation thymique des lymphocytes T par élimination des cellules T auto-réactives (Punt et al., 1994 ;Zakeri et al., 1994). Également, il joue un rôle général pour l'attachement des cellules épithéliales et particulièrement au niveau des tissus qui

nécessitent un taux de renouvellement cellulaire élevé dont les tissus hématopoïétique et ceux de l'épithélium intestinal (Czabotar et al., 2014).

Au niveau fonctionnel, l'apoptose peut être déclenchée par des signaux extracellulaires comme par les facteurs de nécrose tumorale (TNF) et la famille des récepteurs Fas (FasR) (Ashkenazi & Dixit, 1998), les immunoglobulines fixatrices de surface (Tsubata et al., 1993), un problème d'adhésion cellulaire au substrat (Frisch & Francis, 1994), des perturbations intracellulaires comme une modification de la perméabilité des membranes mitochondriales (Green & Reed, 1998) ou l'activation des systèmes de contrôle des dommages intracellulaires.

Une dérégulation de l'apoptose provoque diverses pathologies. Une inhibition de l'apoptose conduit au développement cancéreux ou à des maladies dégénératives, lésionnelles et auto-immunes telle que le Sida où la stimulation du processus apoptotique est excessive (Ichim & Tait, 2016 ; Tait et al., 2014).

En résumé, l'apoptose est un processus de mort cellulaire programmé indispensable pour le fonctionnement de l'homéostasie cellulaire ainsi que pour le développement et le maintien général de l'organisme afin qu'il demeure en bonne santé.

1.2.2 La voie extrinsèque

Un grand nombre de stimuli peuvent provoquer l'apoptose. On reconnaît une famille de récepteurs particulièrement spécialisés dans ce processus qu'on appelle les «récepteurs de mort» qui eux même appartiennent à la grande famille des récepteurs du Facteur Nécrosant des Tumeurs (TnfR) (Nagata, 1997). La stimulation de ces récepteurs de mort induisent l'activation des caspases qui à leurs tours sont impliqués dans l'élimination des cellules potentiellement dangereuses pour l'organisme, notamment les lymphocytes auto-réactifs (Enari et al., 1995); (Longthorne & Williams, 1997). Toutefois, cette voie qui s'avère utile pour entraîner la mort cellulaire est généralement insuffisante. En effet, l'intervention de la mitochondrie est requise.

1.2.3 La voie intrinsèque

La voie intrinsèque ou tout simplement la voie mitochondriale se déclenche par plusieurs stimuli cytotoxiques. Entre autres, le stress oncogène, les agents chimiothérapeutiques et le stress métabolique qui activent les protéines de la famille Bcl-2 permettant ainsi la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP) (Liu et al., 2016).

1.3 La famille Bcl-2

1.3.1 Définition

Cette famille de protéines se compose de deux grands groupes dont la fonction principale est de réguler l'intégrité de la membrane externe mitochondriale (MOM) en fonction des stimuli pro ou anti-apoptotiques reçus par la cellule. Ainsi, la famille Bcl-2 permet le contrôle du déclenchement d'une réponse apoptotique qu'elle soit associée ou non à l'autophagie. Ce qui est particulièrement intéressant sachant que les cellules tumorales ont des propriétés de résistance à la mort cellulaire. Toutefois, ceux-ci provoquent souvent une dérégulation du fonctionnement de la voie de signalisation des protéines Bcl-2 (Hardwick & Soane, 2013)

1.3.2 Classification des membres de la famille Bcl-2

La famille Bcl-2 est classée en deux groupes (**Fig 1.2a**) : protéines anti-apoptotiques qui inhibent l'apoptose (Bcl-2, Bcl-x L , Bcl-w, Mcl-1 et A1) et protéines pro-apoptotiques qui stimulent la mort cellulaire programmée. Les protéines pro-apoptotiques sont divisées en deux sous-classes: les protéines multi-domaines (Bax et Bak) et les protéines BH3-uniquement (Bid, Bim, Puma, Bad, Noxa, Bik, Bmf et Hrk). La protéine Bax peut être inhibée par toutes les protéines anti-apoptotiques tandis que Bak est inhibée principalement par Bcl-x L , Mcl-1 et A1 (**Fig 1.2b**) (Willis et al., 2005).

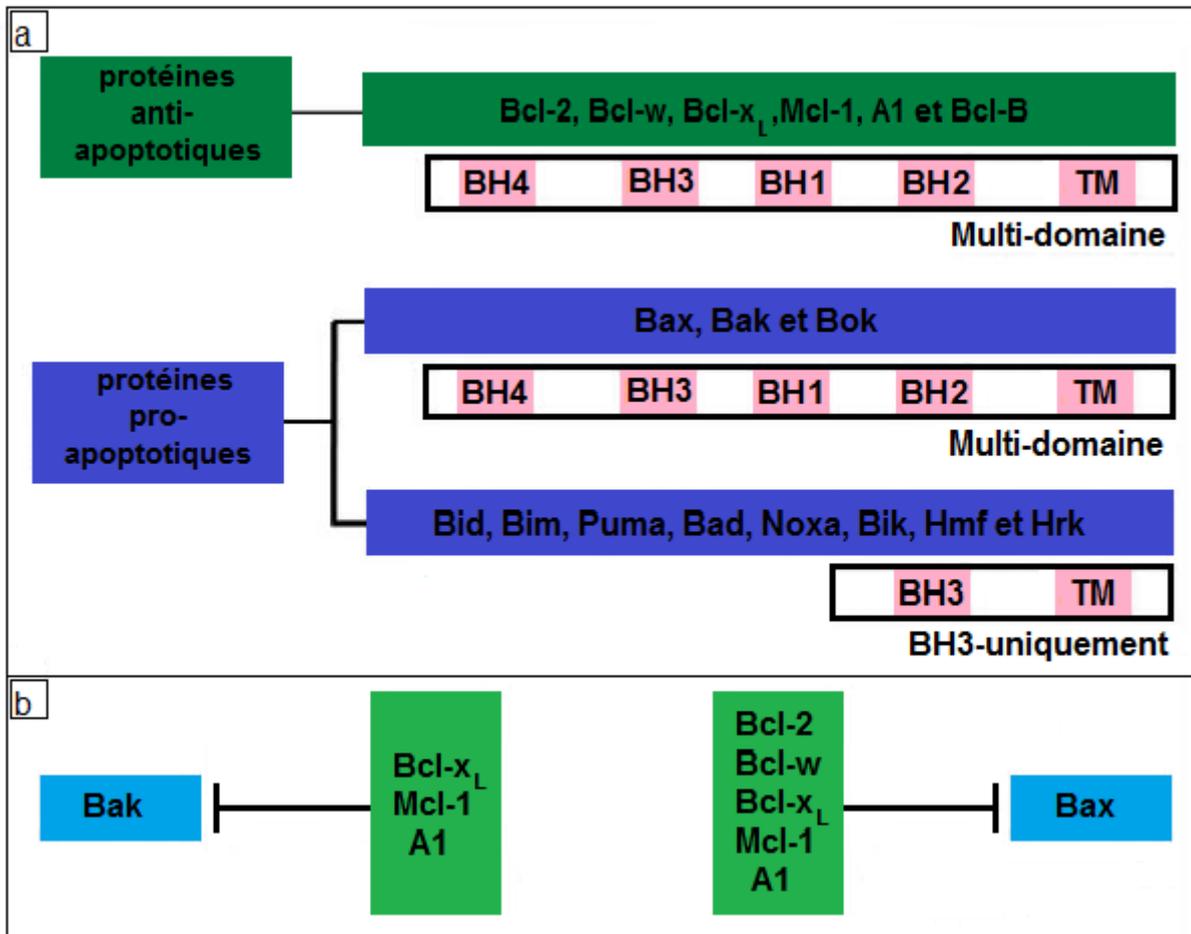


Figure 1.2. Classification des membres de la famille Bcl2 (Chipuk et al., 2010). a. La famille Bcl-2 est classée en deux groupes: protéine anti-apoptotiques qui inhibent l'apoptose (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1 et A1) et protéines pro-apoptotiques qui stimulent la mort cellulaire programmée. Les pro-apoptotiques sont divisées en deux sous-classes: les protéines multi-domaines (Bax et Bak) et les protéines BH3 uniquement (Bid, Bim, Puma, Bad, Noxa, Bik, Bmf et Hrk). b. Bax peut être inhibé par toutes les protéines anti-apoptotiques tandis que Bak est inhibé principalement par Bcl-x_L, Mcl-1 et A1 (Willis et al., 2005).

1.4 Le gène Bax

1.4.1 Définition

Le gène Bax a été identifié pour la première fois en 1993 par le groupe de Stanley J. Korsmeyer comme un hétérodimère avec Bcl-2 (Oltvai et al., 1993), en utilisant l'hybridation fluorescente *in situ* et l'ADN hybride de cellules somatiques humaines et des hamsters. Ce gène se situe sur le chromosome 19 et est organisé en 6 exons et 5 introns (Apte et al., 1995) (**Fig 1.3.**). Il s'agit d'un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2. Il est considéré comme un suppresseur des tumeurs (C. Yin et al., 1997) et code pour une protéine de 21 kDa nommé BAX-alpha dont l'association avec le gène Bcl-2 joue un rôle essentiel dans la régulation de l'apoptose intrinsèque (Apte et al., 1995).

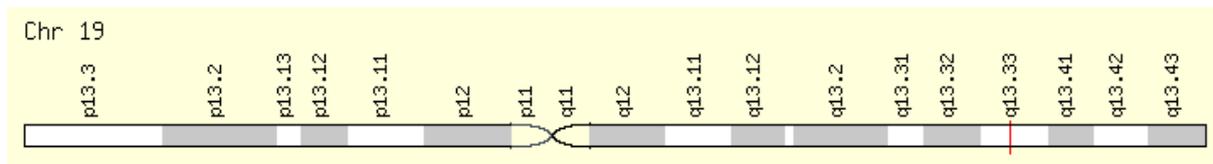


Figure 1.3. Gène BAX en localisation génomique: bandes selon Ensembl, localisations selon GeneLoc

1.4.2 Structure de la protéine Bax

Il s'agit d'une protéine de 21 kD dont la structure tridimensionnelle a été résolue en 2000 par la résonance magnétique nucléaire (RMN)(Suzuki et al., 2000). Bax représente une structure tertiaire similaire à celle des protéines de la famille Bcl-2 (**Fig 1.4a**) (Petros et al., 2004). Elle est constituée de 192 acides aminés et possède 9 hélices α . Quant à sa structure, l'hélice $\alpha 5$ (Ha5) et Ha6 constituent le cœur de la protéine et sont entourées par les 7 autres hélices qui sont amphipathiques et qui gardent leurs parties hydrophiles exposés à l'extérieur (Lalier et al., 2007). À noter que Ha5 et Ha6 sont impliquées dans la formation de pore mitochondrial (Heimlich et al., 2004). N-terminal de Ha1 permet la translocation de Bax au niveau de la mitochondrie grâce à un signal d'adressage mitochondrial (Liu et al., 2016). Il existe une boucle longue et non structurée entre Ha1 et Ha2 dont la séquence d'acides aminés constituant cette région est très variable (Kelekar & Thompson, 1998). Les analyses mutationnelles ont montré que l'hétérodimérisation Bax/Bcl-2 nécessite les domaines BH1, BH2 et BH3 de Bcl-2 et uniquement le domaine BH3 de Bax (Hanada et al., 1995). Le site canonique de la liaison à BH3 est le sillon hydrophobe de la protéine formé par Ha2, Ha3, Ha4 et Ha5.

L'hélice $\alpha 9$ possède une mobilité importante qui assure à la protéine une stabilité conformationnelle (Bleicken & Zeth, 2009). Elle est stabilisée d'une part en interagissant par sa face hydrophobe avec la poche hydrophobe formée par les domaines BH1, Bh2 et BH3 (Suzuki et al., 2000), et d'autres part, en présence de la proline 168, un coude se forme entre les hélices $\alpha 8$ et $\alpha 9$ et c'est ce qui diminue les degrés de liberté dans la mobilité de l'hélice C-terminal. La mutation de la proline 168 en alanine, un petit acide aminé neutre et non codé, rétablit une forte mobilité de l'hélice $\alpha 9$ et semble suffisante à un changement important de conformation de la protéine I (Arokium et al., 2004). Ces hélices et domaines précédemment décrits sont les principaux candidats pour participer à la fonction de Bax. Lors de l'initiation de la voie intrinsèque de l'apoptose, les résidus hydrophobes sur le domaine BH3 (Ser55, Thr56, Leu59, Leu63, Ile66 et Leu70) pointent vers l'intérieur et précisément vers Ha5 / Ha6 et sont couvertes par Ha9 (**Fig 1.4b**). On identifie deux résidus

critiques d'acides aminés : Cys62 dans H α 2 proche du domaine BH3 et Cys126 entre H α 5 et H α 6 qui forment potentiellement un pont disulfure pour l'homo- ou l'hétérodimérisation (Liu et al., 2016). De plus, deux sites de phosphorylation sont identifiés : Ser184, à l'extrémité du C-terminale et Thr167, entre H α 8 et H α 9.

Bax est neutralisé par la phosphorylation de Ser184 par la protéine kinase C zeta (Xin et al., 2007) ou bien par la protéine AKT, tandis que la déphosphorylation de Ser184 par la protéine phosphatase 2A active Bax (Xin & Deng, 2006). La localisation de Bax est influencée par la mutation de cet même acide aminé (Liu et al., 2016).

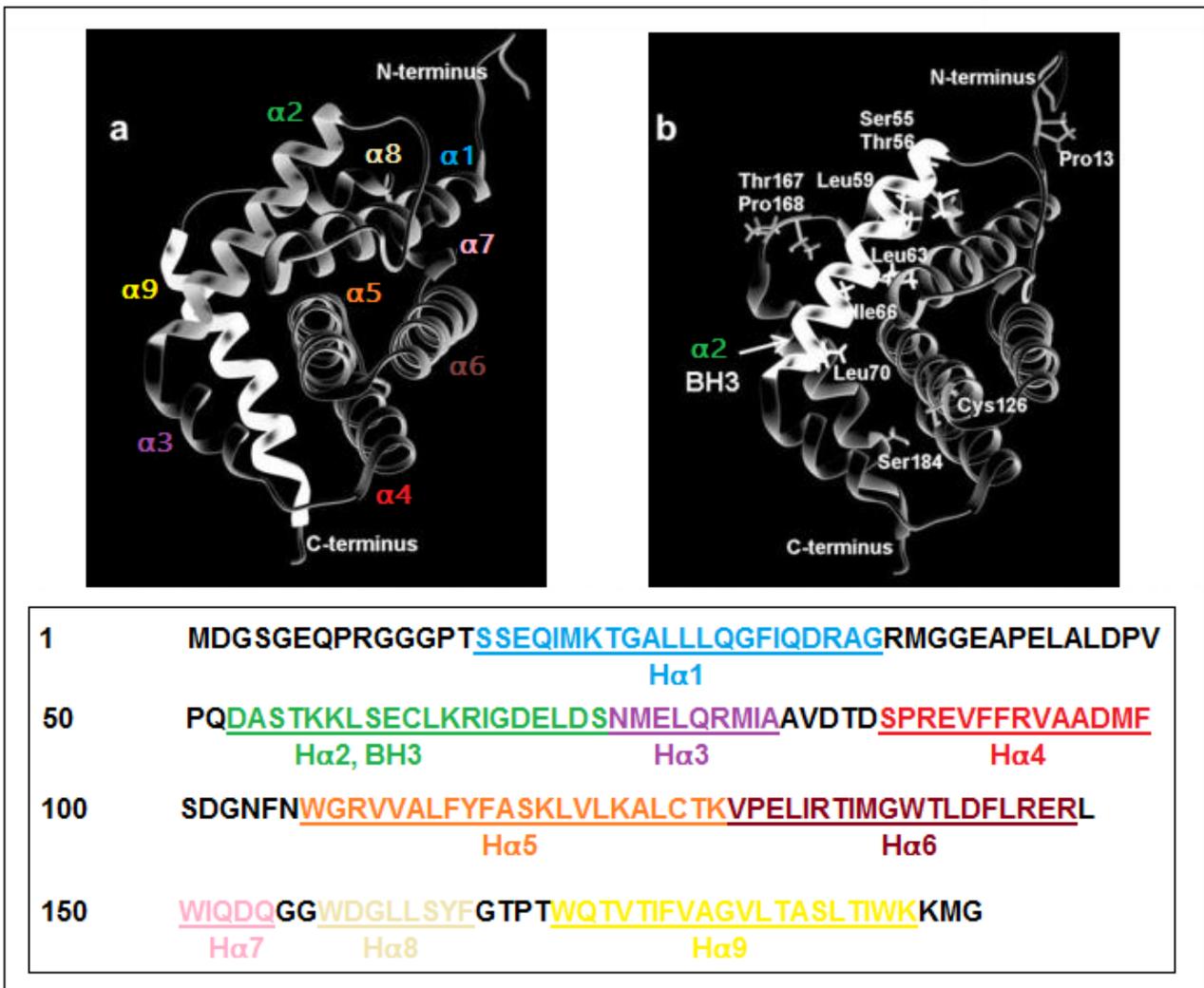


Figure 1.4. Structure de Bax (Liu et al., 2016).

a. Représentation de Bax, les 9 hélices α sont indiquées séparément. H α 2 (hélice α 2) comprend le domaine BH3. H α 5 et H α 6 forment le noyau de la protéine et sont intégrés dans 7 autres hélices. **b.** Les résidus d'acides aminés critiques comme (Cys126, Thr167, Pro168, Pro13 et Ser184) sont mis en évidence, y compris les résidus hydrophobes sur le domaine BH3 tel que (Ser55, Thr56, Leu59, Leu63, Ile66 et Leu70). **c.** Structure primaire de Bax.

1.4.3 Voie d'activation

Les membres de la famille anti-apoptotique (ou pro-survie) Bcl-2 emprisonnent les protéines BH3 uniquement ou neutralisent *Bax* et *Bak* afin d'empêcher l'activation allostérique de *Bax* et par conséquent inhiber le programme mitochondrial ultérieur d'apoptose (X. M. Yin et al., 1994 ; Cheng et al., 2001). Les protéines BH3-uniquement (BH3-only) sont classées en deux groupes: Protéines BH3 de type activateurs telles que *Bid*, *Bim* et *Puma* et les protéines BH3 de type sensibilisateur telles que *Bad*, *Noxa* et *Bik* (Liu et al., 2016). Les BH3 activateurs fonctionnent par la liaison physique directe et par l'activation de *Bax* pour induire l'apoptose, contrairement aux BH3 sensibilisateur qui engagent des protéines anti-apoptotiques pour libérer les activateurs et induire l'apoptose médiée par l'activation de *Bax* (Giam et al., 2008).

Il existe trois différents modèles chez les protéines de la famille Bcl-2 qui permettent le contrôle de l'apoptose.

1.4.3.1 Le modèle d'activation directe

L'association directe des BH3-uniquement avec *Bax/Bak* provoque une série d'événements en aval conduisant à la mort cellulaire (Liu et al., 2016). Les BH3 sensibilisateurs se lient aux protéines anti-apoptotiques pour libérer des activateurs et pour faciliter l'activation de *Bax* induisant ainsi une MOMP (**Fig 1.5a**) (Letai et al., 2002).

1.4.3.2 Le modèle de déplacement

Les protéines BH3-uniquement provoquent indirectement une apoptose par *Bax* ou *Bak* en activant ces dernières et en neutralisant les protéines anti-apoptotiques (Liu et al., 2016). *Bax* et *Bak*, étant actives en permanence suite à cela, sont liées aux protéines anti-apoptotiques de manière constitutive pour empêcher la MOMP. Dans ce mode, l'unique fonction des protéines BH3-uniquement est d'éloigner *Bax* et *Bak* des protéines pro-survie, plutôt que de les lier (**Fig 1.5b**).

1.4.3.3 Le modèle unifié

Llambi a proposé un modèle unifié en suggérant que les deux autres modèles ne sont pas nécessairement exclusifs. Dans celui-ci, les protéines anti-apoptotiques peuvent avoir deux rôles : soit elles séquestrent les BH3-uniquement activateurs et laissent les effecteurs inactifs, soit elles capturent les effecteurs BAX et BAK juste après leur activation par les BH3-uniquement activateurs libres. Quel que soit le mode d'inhibition des anti-apoptotiques, le mode unifié est bloqué par l'action des BH3-only sensibilisateurs (**Fig 1.5c**) (Llambi et al., 2011).

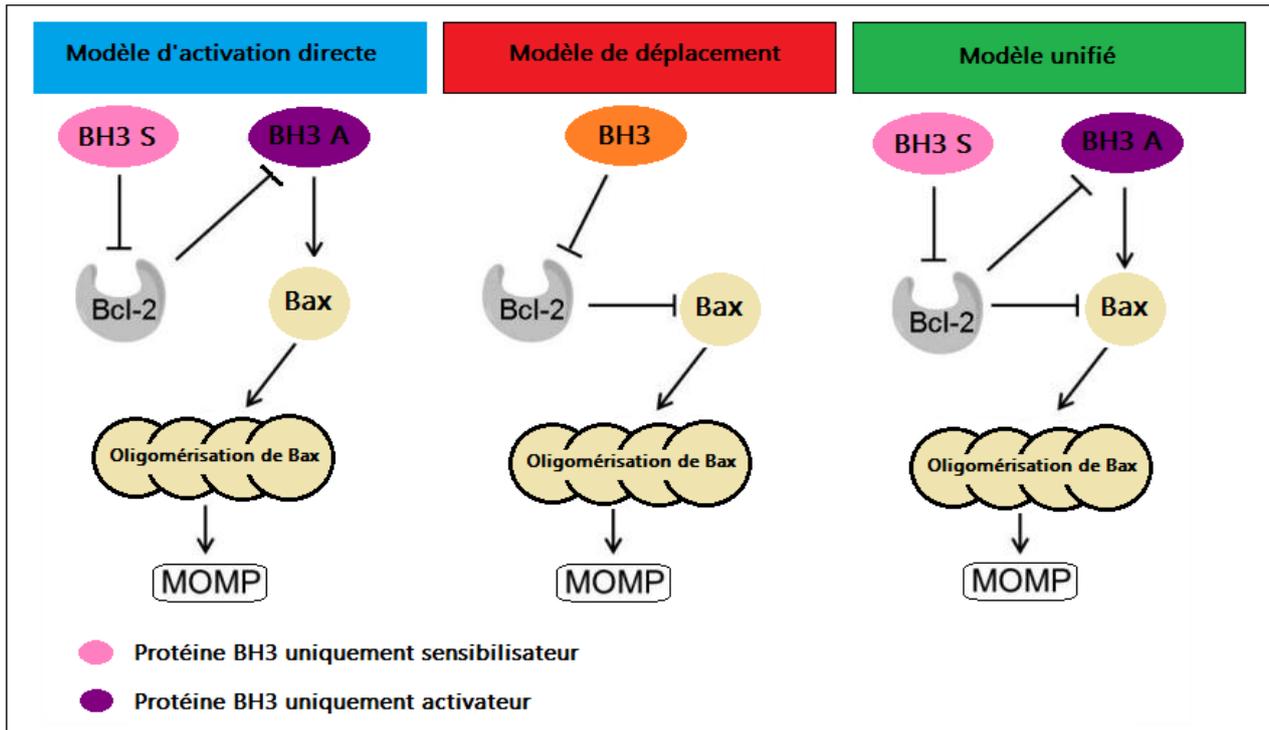


Figure 1.5. Différents modèles de perméabilisation de la membrane externe mitochondriale médiée par l'activation Bax (MOMP) (Czabotar et al., 2014).

a. Le modèle d'activation directe montre que les protéines de type activateur BH3 uniquement se lient et activent directement Bax ou Bak. **b.** Le modèle de déplacement conclut que les protéines BH3 seules déclenchent indirectement l'apoptose par Bax ou Bak en neutralisant les protéines anti-apoptotiques. **c.** Le modèle unifié attribue des fonctions doubles aux protéines pro-survie en séquestrant non seulement les protéines activatrices de type BH3 uniquement, mais également les formes actives de Bax et Bak.

1.4.4 Fonction et signalisation

Bax est un point d'entrée unique pour la signalisation apoptotique intrinsèque (**Fig1.6**). Cette voie est initiée par divers stimuli tels que les dommages à l'ADN, la privation de cytokines ou le stress cytotoxique (Liu et al., 2016). Celle-ci est activée via une diminution des signaux de survie (Carpenter & Brady, 2020).

La régulation transcriptionnelle du gène Bax se produit en grande partie par le suppresseur de tumeur P53 (Chipuk et al., 2004). Dans les cellules saines, Bax est principalement un monomère inactif. Il est soit cytosolique avec une liaison et une insertion minimales dans la membrane mitochondriale externe ou bien il est attaché de manière lâche à la membrane du réticulum mitochondrial, nucléaire ou endoplastique (Liu et al., 2016). Une fois que Bax est hétérodimérisée avec Bcl-2 et Bcl-xl, elle devient active et fonctionnelle (Carpenter & Brady, 2020). Cette activation provoque des changements de conformation de Bax qui conduisent à une translocation vers la MOM. La présence des signaux pro-survie, tels que Bcl-xl et Bcl-2, est nécessaire pour éviter l'accumulation de Bax sur la membrane

mitochondriale externe des cellules saines (Edlich et al., 2011). Ensuite, Bax insère sa structure alpha-hélicoïdale amphipathique directement dans le MOM induisant ainsi la formation des pores dans la membrane et la perméabilisation de la MOM (MOMP) (Shamas-Din et al., 2013). Suite à cela, le MOMP entraîne un gonflement mitochondriale provoquant une dépolarisation de la membrane qui s'ensuit par la libération du contenu mitochondrial, incluant entre autres le cytochrome c, l'endonucléase G et complexe supramoléculaire d'adhésion (Smac) / Diablo homolog (DIABLO) (Narita et al., 1998a), via une ouverture dépendante du calcium (Ca^{+}) des pores transition de perméabilité (PT). Les molécules cytochrome c, Apoptotic peptidase activating factor 1 (Apaf-1), Adénosine-Triphosphate (ATP) et procaspase-9 forment un apoptosome qui active la caspase 9 (Narita et al., 1998b) entraînant, en conséquence, une activation en aval d'autres caspases de bourreau pour aboutir enfin à la mort cellulaire (Li et al., 1997). Les changements morphologiques dans la cellule apoptotique comprennent la pycnose (condensation et rétrécissement nucléaires), le rétrécissement cellulaire et le saignement membranaire. Ceux-ci conduisent finalement à la libération de vésicules renfermant des contenus cellulaires qui seront phagocytés par les cellules survivantes (Zhang et al., 2018).

Bax participe également à la voie apoptotique extrinsèque médiée par les récepteurs transmembranaires de la mort. Il renforce la voie extrinsèque lorsque la caspase 8 clive Bid pour générer le t-Bid activé (**Fig 1.6**) (Czabotar et al., 2014).

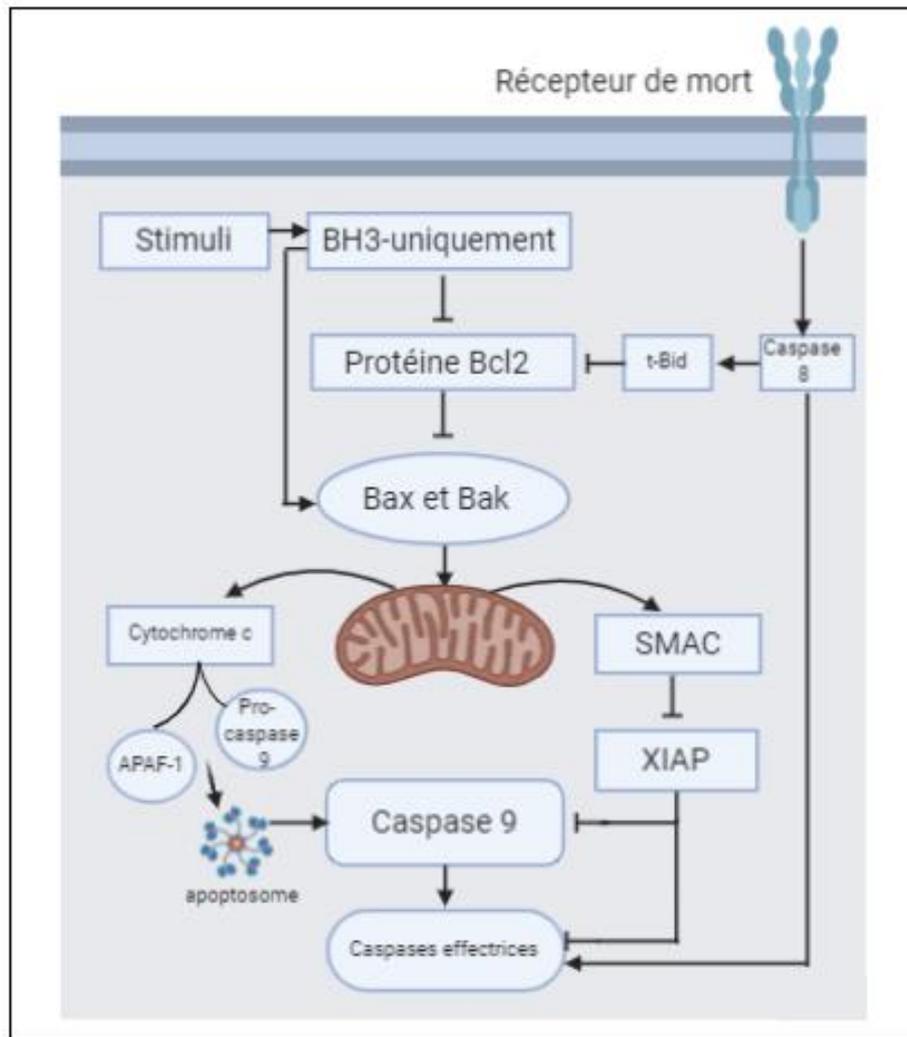


Figure 1.6. Processus apoptotique intrinsèque par la famille Bcl-2 et extrinsèque via les récepteurs de mort (Czabotar et al., 2014). Plusieurs stimuli pro-apoptotiques comme le stress oncogénique, des dommages à l'ADN ou des privations en signaux prolifératifs engagent la voie d'apoptose mitochondriale médiée par la famille Bcl2. Ces stimuli se dirigent vers une activation des membres BH3-only qui engendrent l'activation des effecteurs Bax et Bak en inhibant les protéines de la famille Bcl2. Sous leurs formes actives, les protéines pro-apoptotiques vont être oligomérisées et vont induire une perméabilisation dans la membrane mitochondriale. S'en suit la libération de protéines inter-membranaires mitochondriales, comme le cytochrome C ou SMAC. Le cytochrome C accompagné de la protéine APAF-1, ATP et proapoptosome-9 assure l'activation de la caspase 9. SMAC inhibe la protéine XIAP en assurant le maintien de l'activité des caspases. La voie d'apoptose extrinsèque est déclenchée par la fixation de ligands sur les récepteurs de mort. La voie de signalisation aux récepteurs de mort tel que Fas et TNF-R conduit à l'activation de la caspase 8, ce qui induit ensuite le clivage et l'activation de tBid.

1.5 Technique de la PCR

1.5.1 Principe de la PCR

La réaction en chaîne par polymérase (Polymerase Chain Reaction, PCR) ou encore (ACP pour amplification en chaîne par polymérase) est un test enzymatique qui permet une amplification rapide d'un segment spécifique d'ADN. Elle peut être réalisée à partir d'un ADN provenant de divers tissus et organismes, y compris le sang périphérique, la peau, les cheveux, la salive et les microbes en utilisant des méthodes de laboratoire conventionnelles (Garibyan & Avashia, 2013). Kary Mullis, celui qui a mis au point le test PCR, a affirmé «qu'il vous permet de choisir le morceau d'ADN qui vous intéresse et d'en avoir autant que vous le souhaitez» (Mullis, 1990). Grâce à cette technique, des milliards de copies d'un fragment d'ADN ou d'un gène spécifique peuvent être produits, ce qui permet la détection et l'identification de séquences géniques à l'aide de techniques visuelles basées sur la taille et la charge (Garibyan & Avashia, 2013).

1.5.2 Applications de la PCR

Cette technique puissante a de nombreuses applications en diagnostic des pathologies, notamment dans les domaines de la microbiologie, de la génétique et de l'oncologie (Chan et al., 2005).

1.5.3 Étapes de la PCR

Chaque cycle de PCR est constitué de trois phases différentes à trois températures différentes : la dénaturation, l'hybridation et l'élongation (ou extension des amorces) (Lo et al., 2006). D'abord, nous utilisons une température de dénaturation initiale de 94 ° C pendant 8 min afin de séparer les deux brins d'ADN en interrompant les liaisons hydrogène. Ensuite nous utilisons une température et une durée du temps nécessaire pour l'hybridation des amorces. Cela dépend de la composition de base et de la longueur et la concentration des amorces. L'utilisation des amorces de 18-30 bases de longueur avec environ une teneur en GC de 50% et un recuit de 55 ° C pendant 1-2 min, cette étape permet aux amorces sens et anti-sens de s'hybrider aux ADN matrice. L'extension d'amorce est typiquement effectuée à 72 ° C, qui est proche de la température optimale de la Taq polymérase. Un temps d'extension de 1 min est généralement suffisant pour les produits jusqu'à 2 kb de longueur (Lo et al., 2006).

1.5.4 Acteurs de la PCR

Chaque test PCR nécessite la présence d'ADN matrice, de nucléotides, d'ADN polymérase, et d'amorces. Les nucléotides comprennent les quatre bases - adénine,

thymine, cytosine et guanine (A, T, C, G). L'ADN polymérase est l'enzyme clé qui relie les nucléotides individuels pour former le produit de la PCR. Les amorces sont de courts fragments d'ADN avec une séquence définie complémentaire de l'ADN cible qui doit être détecté et amplifié. Ceux-ci servent de point d'extension sur lequel s'appuie l'ADN polymérase (Garibyan & Avashia, 2013).

1.6 Problématique et Objectifs

Le cancer est une pathologie due à une accumulation des mutations et une altération génétique avec un système de réparation d'ADN dysfonctionnel, ce qui va engendrer des transformations phénotypiques des cellules, une prolifération excessive et une résistance à l'apoptose. *Bax* est un gène pro-apoptotique qui code pour la protéine Bax. L'étude de l'expression de ce gène au cours du cancer permet d'ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques anticancéreuses.

Objectif

L'objectif de ce travail est de concevoir des amorces pour le gène Bax pendant le processus cancéreux.

But

Étudier l'implication du gène Bax dans l'immunité anti tumorale par la réalisation d'une PCR.

Chapitre 2. Matériel et méthodes

2.1 Conception des amorces

La conception d'amorces appropriées est essentielle au succès d'une expérience de PCR. Les caractéristiques à prendre en considération lors de la conception des amorces sont les suivantes (Lorenz, 2012) :

- La longueur de l'amorce doit être de 15 à 30 nucléotidiques (bases).
- La teneur optimale en GC doit être comprise entre 40 et 60%.
- L'extrémité 3' des amorces doit contenir un G ou C afin de serrer l'amorce et d'empêcher la "respiration" des extrémités, augmentant ainsi l'efficacité de l'amorçage.
- Les extrémités 3' d'un ensemble d'amorces, qui comprend une amorce de brin plus et une amorce de brin moins, ne doivent absolument pas être complémentaires l'une de l'autre, et l'extrémité 3' d'une seule amorce ne peut pas non plus être complémentaire à d'autres séquences de l'amorce.
- Les températures de fusion optimales (T_m) pour les apprêts se situent entre 52 et 58 ° C. La T_m finale pour les deux amorces ne doit pas dépasser 5 °C.
- Les répétitions de di-nucléotides (par exemple, GCGCGCGCGC ou ATATATATAT) ou les analyses d'une seule base (par exemple, AAAAA ou CCCCC) doivent être évitées car elles peuvent provoquer un glissement le long du segment amorcé de l'ADN et/ou des structures en boucle en épingle à cheveux.

2.2 Séquence du gène *Bax*

Afin d'obtenir la séquence du gène *Bax*, on doit accéder à la base de données ENSEMBL à partir du site www.ensembl.org (**Fig 2.1**).

2.3 L'outil de primer BLAST

Afin de concevoir les amorces spécifiques au gène *Bax*, il est impératif d'accéder à l'outil Primer blast (**Fig 2.4**) à partir du centre national de l'information biotechnologique (NCBI) www.Ncbi.nlm.nih.Gov (**Fig 2.3**).

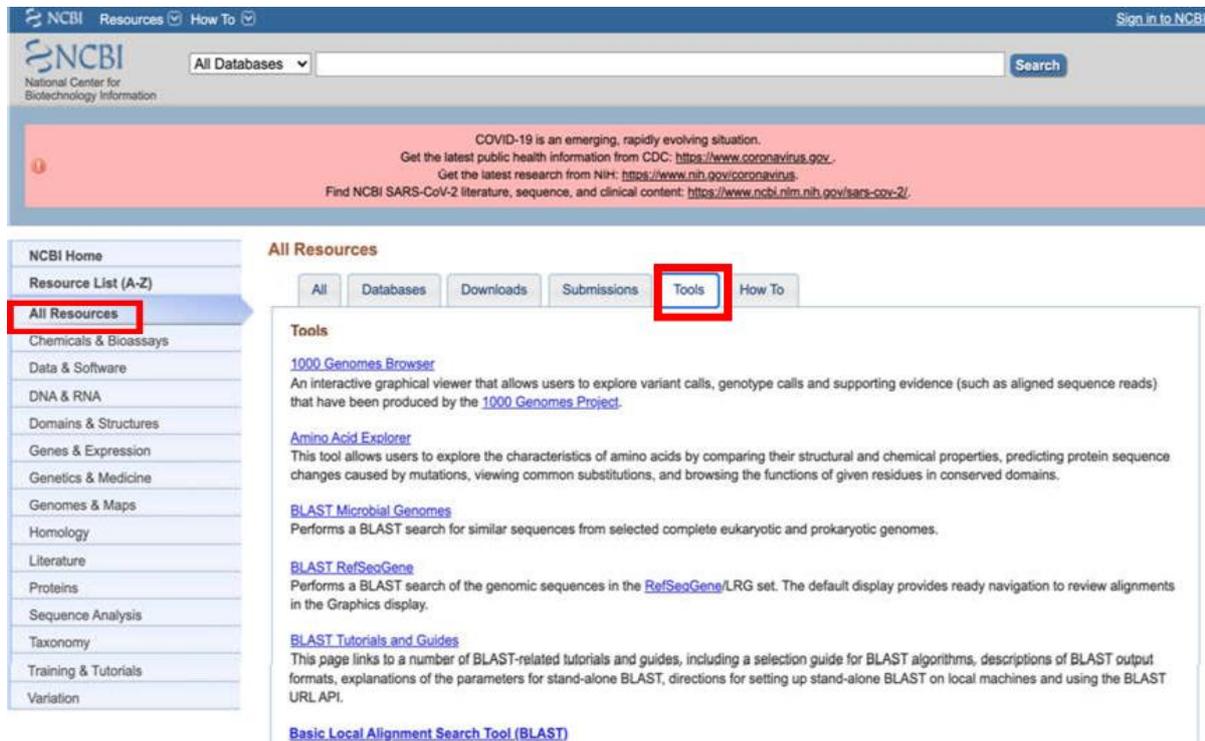


Figure 2.3 La base de données NCBI

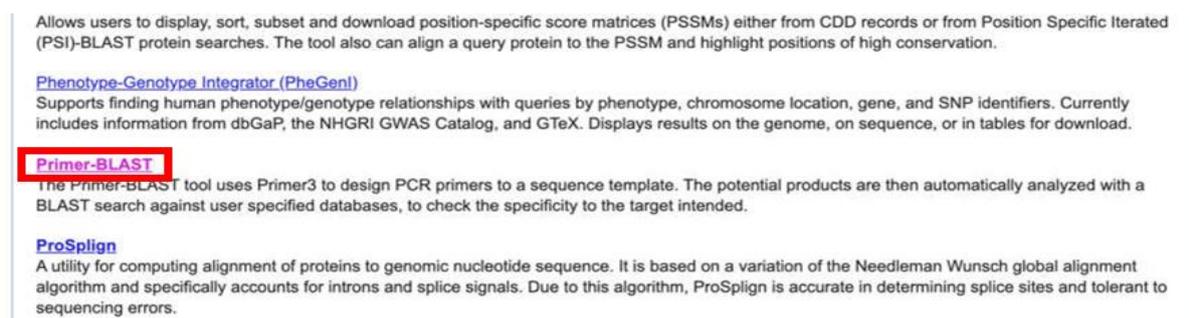


Figure 2.4 L'outil Primer BLAST

Pour commencer, on doit d'abord copier la séquence encadrée (exon 4) et la coller dans la case (Faste), sans oublier d'effacer les intervalles non séparables à l'intérieur de notre amorce. L'obtention des résultats voulus nécessite la mention de certains paramètres et caractéristiques lors de la conception des amorces (**Fig 2.5**) et (**Fig 2.6**).

Chapitre 2. Matériel et Méthodes

The screenshot shows the Primer-BLAST web interface. The top navigation bar includes the NIH logo and the text "U.S. National Library of Medicine" and "NCBI National Center for Biotechnology Information". The main heading is "Primer-BLAST" with the subtitle "A tool for finding specific primers". Below this, there are links for "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: "SCGGGAGTGTCTCACCGCTCACTCACCATCTGGAAGAGATGGGCTGAGGCCCCAGCTGCTTGGACTGTGTTTTCTCTCATAAATTATGSCATTTTCTGGGAGGGGTGGGATGGGGACGTGGCATTCTTCTACTTTTGTAAATTATGGGGGGTGTGGGAGAGATGTCTTGAAGGGGTATAAACCTCTTGGGGACACTTCGGCATCTGAGTCACTGGGCCCTCTGCCCGCTC". Below the text area are fields for "Forward primer" (position 1) and "Reverse primer" (position 78). A red box highlights the "Range" section, which includes "From" (1) and "To" (300) fields.

The "Primer Parameters" section includes fields for "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 (Tm)" (Min: 57.0, Opt: 60.0, Max: 63.0, Max Tm 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 a note: "Minimal and maximal number of bases that must anneal to exons at the 5' or 3' side of the junction".

Figure 2.5 Analyse de la séquence d'intérêt par Primer BLAST.

The screenshot shows the "Primer Pair Specificity Checking Parameters" section of the Primer-BLAST interface. At the top, there are "Intron length range" fields (Min: 1000, Max: 1000000). Below this is a note: "Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow".

The "Primer Pair Specificity Checking Parameters" section includes:

- "Specificity check": Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template.
- "Search mode": Automatic.
- "Database": Genomes for selected organisms (primary reference assembly only) (highlighted in yellow).
- "Exclusion": Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix) and Exclude uncultured/environmental sample sequences.
- "Organism": Homo sapiens.

Below this are fields for "Entrez query (optional)", "Primer specificity stringency" (Primer must have at least 2 total mismatches to unintended targets, including at least 2 mismatches within the last 5 bps at the 3' end, ignore targets that have 6 or more mismatches to the primer), "Max target size" (4000), and "Allow splice variants" (Allow primer to amplify mRNA splice variants).

At the bottom, there is a "Get Primers" button (highlighted in red) and checkboxes for "Show results in a new window" and "Use new graphic view". A final note at the bottom right says: "Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow".

Figure 2.6 Primer BLAST et les caractères sélectionnés.

2.4 PCR *in-silico*

In silico-PCR est un outil de bio-informatique qui fait partie de la plateforme UCSC genome browser (genome.ucsc.edu) permettant une analyse de confirmation de la paire d'amorce choisies (Fig 2.7).

UNIVERSITY OF CALIFORNIA
SANTA CRUZ Genomics Institute

UCSC Genome Browser

Genomes Genome Browser Tools Mirrors Downloads My Data Projects Help About Us

UCSC In-Silico PCR

Genome: Assembly: Target: Forward Primer: Reverse Primer:

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

About In-Silico PCR

In-Silico PCR searches a sequence database with a pair of PCR primers, using an indexing strategy for fast performance. See an example [video](#) on our YouTube channel.

Configuration Options

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

Figure 2.7 Le logiciel *in-silico* PCR

Chapitre 3. Résultats

3.1 Résultats de Primer BLAST

La conception d'amorces nécessite l'accès aux différents outils de bio-informatique utilisés en plusieurs étapes. Après avoir suivi ces différentes étapes, nous avons obtenu 10 paires d'amorces spécifiques du gène *Bax*.

Parmi les 10 paires d'amorces, on a choisi la paire d'amorce (1) (**Fig 3.1**) car elle répond aux critères de bonnes amorces.

-**Température de fusion** : directe 59,89°C, inverse 59,96°C.

-**Longueur** : directe 20 nucléotides, inverse 20 nucléotides.

-**Teneur en GC** : directe 50%, inverse 55%.

-**Amorces spécifique** : moins de 1000 paires de base (873).

-**Produit aspécifique** : tous plus de 1000 paires de base.

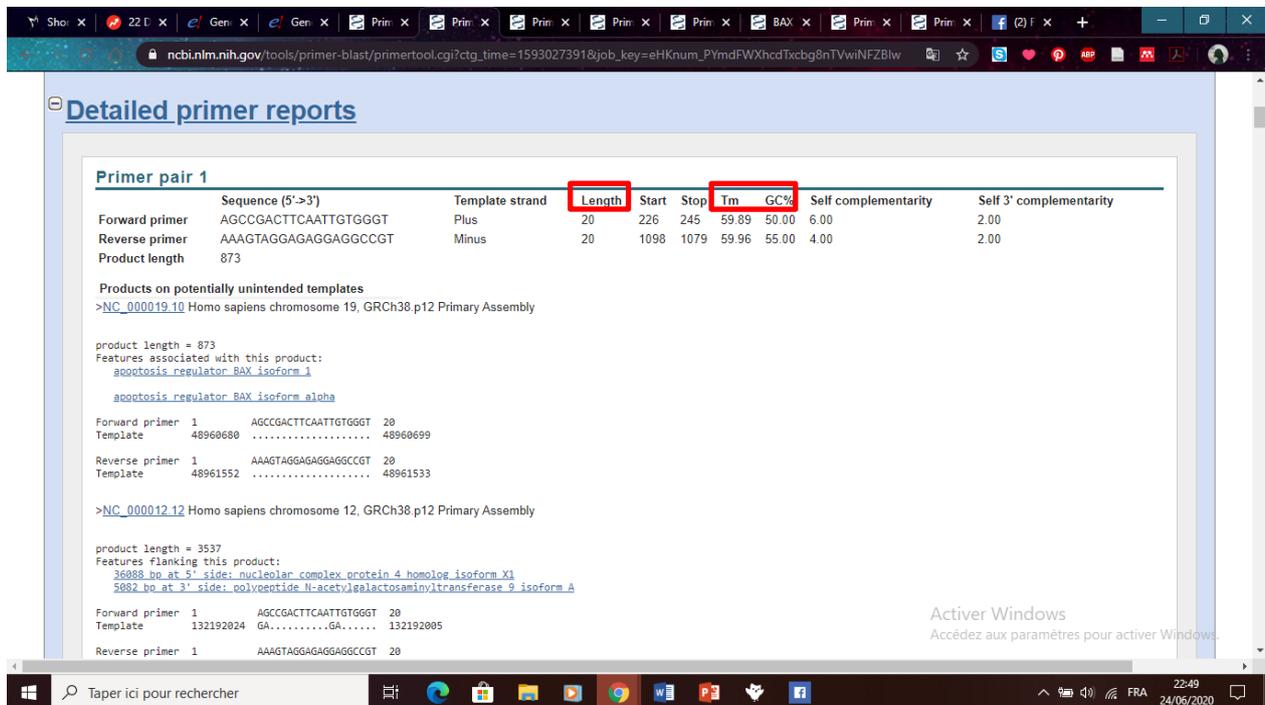


Figure 3.1 Résultats à partir d'outil Primer-BLAST

3.2 Confirmation des résultats

La confirmation des résultats est la dernière étape de notre travail, elle se fait en utilisant le logiciel *in-Silico* PCR via le site <https://genome.ucsc.edu>. Ce programme permet de préciser l'emplacement de notre produit spécifique sur le chromosome 19 et de prouver la spécificité de l'amorce (**Fig 3.2**)

Chapitre 3. Résultats

The screenshot displays the UCSC In-Silico PCR tool interface. At the top, there is a navigation bar with links for Genomes, Genome Browser, Tools, Mirrors, Downloads, My Data, Projects, Help, and About Us. Below this, the tool's name "UCSC In-Silico PCR" is shown. The search parameters are as follows: Genome: Human (dropdown), Assembly: Dec. 2013 (GRCh38/hg38) (dropdown), Target: genome assembly (dropdown), Forward Primer: AGCCGACTTCAATTGTGGG (input field), Reverse Primer: AAAGTAGGAGAGGAGGCC (input field), Max Product Size: 4000 (input field), Min Perfect Match: 15 (input field), Min Good Match: 15 (input field), and Flip Reverse Primer: . A "submit" button is located to the right of the primer input fields. Below the search form, there is an "About In-Silico PCR" section explaining the tool's function and a "Configuration Options" section with detailed instructions for each parameter. The main results section, titled "UCSC In-Silico PCR", shows the genomic coordinates >chr19:48968680+48961552 873bp and the corresponding DNA sequence. The forward primer sequence is highlighted in red. Below the sequence, the "Primer Melting Temperatures" section provides the calculated melting temperatures: Forward: 61.8 C and Reverse: 59.3 C, with a note that calculations assume 50 mM salt and 50 nM oligo concentration.

Genomes Genome Browser Tools Mirrors Downloads My Data Projects Help About Us

UCSC In-Silico PCR

Genome: Assembly: Target: Forward Primer: Reverse Primer:

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

About In-Silico PCR

In-Silico PCR searches a sequence database with a pair of PCR primers, using an indexing strategy for fast performance. See an example [video](#) on our YouTube channel.

Configuration Options

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

UCSC In-Silico PCR

>chr19:48968680+48961552 873bp AGCCGACTTCAATTGTGGG AAAGTAGGAGAGGAGGCCGT
AGCCGACTTCAATTGTGGGAAAGTAGGAGAGGAGGCCGT
tgacaaggaggtttggggcactatctccaggcagtgaggacaaggttc
agtcctaacgccactccactccccacagccctgtgaccaaggtgccc
ggaagtcatcagaaccatcatggctggacattggactcctctcgggagc
ggctgtggctggatcaagaccagggtgggtgggtgagactcctcaag
cctctcaccaccacccgccctcaccaccgccctcccaccgctc
cctgccccccgacctcctctgggacctggccttctgagcaggtcac
agtgtgcccctctccccctctcagatcatcagatgtgctataatgcg
tttctctagtgctgatcaatccccgattcatcaccctgtgacctc
ccagtaccctgacctcactgtgacctgactgattagtgctctctgc
cctcctggagcctccactgctctggaattgctcaagttcattgatgac
cctctgacctagctcttcttttttttttccccactgagaagggg
tctcctatgtgcccaggtggtctggaactcctggcctcaagcagatcc
tcccgcctcagcctcaaggtgctggaattcaggtgtgagccacatg
cctgacctgagtcagctcttaatgccccttcatctcagtcctctgcc
gcaatcctgctcttggcctcctcctgatccgctctgctgctgcc
cagggtgctccccctggccagtcactgaaagcagtgatgctcctctccc
aggACGGCCTCCTCTACTTT

Primer Melting Temperatures

Forward: 61.8 C agccgacttcaattgtgggt
Reverse: 59.3 C aaagtaggagagagagccgt
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](#).

Figure 3.2 Confirmation des résultats par le logiciel in-Silico PCR

Chapitre 4. Conclusions et perspectives

Le cancer est une maladie complexe provoquée par une altération du génome des cellules normales, conduit à une prolifération anarchique et une résistance à l'apoptose. Ces cellules vont évoluer vers des tissus précancéreux et puis vers une tumeur.

Le gène *Bax* (Bcl-2 Associated X-protein) est un membre de la famille des gènes *Bcl-2*. Il code pour une protéine nommée BAX, dont l'association avec Bcl-2 joue un rôle pro-apoptotique important. L'étude de l'expression de ce gène permet de mieux comprendre l'effet du *Bax* contre les cancers.

Ce travail a pour but de concevoir des amorces du gène *Bax* qui sont utilisées par la suite dans une réalisation d'une PCR, afin d'étudier l'expression de ce gène au cours du cancer.

La mise en évidence de la technique PCR en utilisant de bonnes amorces de ce gène pro-apoptotique pourrait offrir à l'avenir de nouvelles méthodes et alternatives de diagnostic et de thérapie contre le cancer.

Références bibliographiques

- Apte, S. S., Mattei, M. G., & Olsen, B. R. (1995). Mapping of the human BAX gene to chromosome 19q13.3-q13.4 and isolation of a novel alternatively spliced transcript, BAX delta. *Genomics*, 26(3), 592-594. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(95\)80180-t](https://doi.org/10.1016/0888-7543(95)80180-t)
- Arokium, H., Camougrand, N., Vallette, F. M., & Manon, S. (2004). Studies of the interaction of substituted mutants of BAX with yeast mitochondria reveal that the C-terminal hydrophobic alpha-helix is a second ART sequence and plays a role in the interaction with anti-apoptotic BCL-xL. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(50), 52566-52573. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408373200>
- Ashkenazi, A., & Dixit, V. M. (1998). Death receptors: Signaling and modulation. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5381), 1305-1308. <https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1305>
- Berenblum, I., & Shubik, P. (1947). The role of croton oil applications, associated with a single painting of a carcinogen, in tumour induction of the mouse's skin. *British Journal of Cancer*, 1(4), 379-382. <https://doi.org/10.1038/bjc.1947.35>
- Bleicken, S., & Zeth, K. (2009). Conformational changes and protein stability of the pro-apoptotic protein Bax. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 41(1), 29-40. <https://doi.org/10.1007/s10863-009-9202-1>
- Boon, T., & van der Bruggen, P. (1996). Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 183(3), 725-729. <https://doi.org/10.1084/jem.183.3.725>
- Bryan, T. M., & Cech, T. R. (1999). Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(3), 318-324. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(99\)80043-X](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(99)80043-X)
- Burnet, F. M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Progress in Experimental Tumor Research*, 13, 1-27. <https://doi.org/10.1159/000386035>
- Butterworth, B. E., Eldridge, S. R., Sprankle, C. S., Working, P. K., Bentley, K. S., & Hurtt, M. E. (1992). Tissue-specific genotoxic effects of acrylamide and acrylonitrile. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 20(3), 148-155. <https://doi.org/10.1002/em.2850200303>
- Chan, C.-C., Shen, D., & Tuo, J. (2005). Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis of Uveitis. *International ophthalmology clinics*, 45(2), 41-55.
- Carpenter, R., & Brady, M. F. (2020). BAX Gene. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555927/>
- Cheng, E. H., Wei, M. C., Weiler, S., Flavell, R. A., Mak, T. W., Lindsten, T., & Korsmeyer, S. J. (2001). BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Molecular Cell*, 8(3), 705-711. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00320-3](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00320-3)
- Chipuk, J. E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N. M., Newmeyer, D. D., Schuler, M., & Green, D. R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5660), 1010-1014. <https://doi.org/10.1126/science.1092734>
- Chipuk, J. E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M. J., & Green, D. R. (2010). The BCL-2 family reunion. *Molecular Cell*, 37(3), 299-310. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.025>
- Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., & Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(1), 49-63. <https://doi.org/10.1038/nrm3722>
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S.,

Chapitre 5. Références bibliographiques

- Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., ... Futreal, P. A. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, *417*(6892), 949-954. <https://doi.org/10.1038/nature00766>
- Dixon, K., & Kopras, E. (2004). Genetic alterations and DNA repair in human carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, *14*(6), 441-448. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2004.06.007>
- Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, *21*(2), 137-148. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.017>
- Edlich, F., Banerjee, S., Suzuki, M., Cleland, M. M., Arnoult, D., Wang, C., Neutzner, A., Tjandra, N., & Youle, R. J. (2011). Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell*, *145*(1), 104-116. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.034>
- Enari, M., Hug, H., & Nagata, S. (1995). Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. *Nature*, *375*(6526), 78-81. <https://doi.org/10.1038/375078a0>
- Frisch, S. M., & Francis, H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, *124*(4), 619-626. <https://doi.org/10.1083/jcb.124.4.619>
- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *The Journal of investigative dermatology*, *133*(3), e6. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- Gasser, S., & Raulet, D. H. (2006). The DNA damage response arouses the immune system. *Cancer Research*, *66*(8), 3959-3962. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4603>
- Giam, M., Huang, D. C. S., & Bouillet, P. (2008). BH3-only proteins and their roles in programmed cell death. *Oncogene*, *27 Suppl 1*, S128-136. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.50>
- Gong, J., Zhang, J.-P., Li, B., Zeng, C., You, K., Chen, M.-X., Yuan, Y., & Zhuang, S.-M. (2013). MicroRNA-125b promotes apoptosis by regulating the expression of Mcl-1, Bcl-w and IL-6R. *Oncogene*, *32*(25), 3071-3079. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.318>
- Green, D. R., & Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science (New York, N.Y.)*, *281*(5381), 1309-1312. <https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1309>
- Hanada, M., Aimé-Sempé, C., Sato, T., & Reed, J. C. (1995). Structure-function analysis of Bcl-2 protein. Identification of conserved domains important for homodimerization with Bcl-2 and heterodimerization with Bax. *The Journal of Biological Chemistry*, *270*(20), 11962-11969. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.20.11962>
- Hanahan, D., & Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, *86*(3), 353-364. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80108-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80108-7)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*(1), 57-70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, Douglas, & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, *144*(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hardwick, J. M., & Soane, L. (2013). Multiple functions of BCL-2 family proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008722>
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, *25*, 585-621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)
- Heimlich, G., McKinnon, A. D., Bernardo, K., Brdiczka, D., Reed, J. C., Kain, R., Krönke, M., & Jürgensmeier, J. M. (2004). Bax-induced cytochrome c release from mitochondria depends on alpha-helices-5 and -6. *The Biochemical Journal*, *378*(Pt 1), 247-255. <https://doi.org/10.1042/BJ20031152>
- Hotz, B., Arndt, M., Dullat, S., Bhargava, S., Buhr, H.-J., & Hotz, H. G. (2007). Epithelial to mesenchymal transition: Expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic

- cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(16), 4769-4776. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2926>
- Kelekar, A., & Thompson, C. B. (1998). Bcl-2-family proteins: The role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends in Cell Biology*, 8(8), 324-330. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(98\)01321-x](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(98)01321-x)
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239-257. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>
- Lalier, L., Cartron, P.-F., Juin, P., Nedelkina, S., Manon, S., Bechinger, B., & Vallette, F. M. (2007). Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 12(5), 887-896. <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0749-1>
- Letai, A., Bassik, M. C., Walensky, L. D., Sorcinelli, M. D., Weiler, S., & Korsmeyer, S. J. (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*, 2(3), 183-192. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(02\)00127-7](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(02)00127-7)
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., & Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91(4), 479-489. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80434-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80434-1)
- Liu, Z., Ding, Y., Ye, N., Wild, C., Chen, H., & Zhou, J. (2016). Direct Activation of Bax Protein for Cancer Therapy. *Medicinal research reviews*, 36(2), 313-341. <https://doi.org/10.1002/med.21379>
- Llambi, F., Moldoveanu, T., Tait, S. W. G., Bouchier-Hayes, L., Temirov, J., McCormick, L. L., Dillon, C. P., & Green, D. R. (2011). A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Molecular Cell*, 44(4), 517-531. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.10.001>
- Lo, Y. M. D., Chiu, R. W. K., Walker, J. M., Arndt, K., Nussinov, R., & Verma, E. P. J. (2006). 335. *Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid*.
- Longthorne, V. L., & Williams, G. T. (1997). Caspase activity is required for commitment to Fas-mediated apoptosis. *The EMBO Journal*, 16(13), 3805-3812. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.13.3805>
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 63. <https://doi.org/10.3791/3998>
- Martinou, J.-C., & Youle, R. J. (2011). Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Developmental Cell*, 21(1), 92-101. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.06.017>
- Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), 56-61, 64-65. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0490-56>
- Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell*, 88(3), 355-365. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81874-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81874-7)
- Narita, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., Lutz, R. J., Matsuda, H., & Tsujimoto, Y. (1998a). Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25), 14681-14686. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.14681>

- Narita, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., Lutz, R. J., Matsuda, H., & Tsujimoto, Y. (1998b). Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(25), 14681-14686. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.14681>
- Oliveira, P. A., Colaço, A., Chaves, R., Guedes-Pinto, H., De-La-Cruz P., L. F., & Lopes, C. (2007). Chemical carcinogenesis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, *79*(4), 593-616. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652007000400004>
- Oltvai, Z. N., Milliman, C. L., & Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, *74*(4), 609-619. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90509-o](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90509-o)
- Petros, A. M., Olejniczak, E. T., & Fesik, S. W. (2004). Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1644*(2-3), 83-94. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2003.08.012>
- Pitot, H. C. (2001). Animal models of neoplastic development. *Developments in Biologicals*, *106*, 53-57; discussion 57-59, 143-160.
- Punt, J. A., Osborne, B. A., Takahama, Y., Sharrow, S. O., & Singer, A. (1994). Negative selection of CD4+CD8+ thymocytes by T cell receptor-induced apoptosis requires a costimulatory signal that can be provided by CD28. *The Journal of Experimental Medicine*, *179*(2), 709-713. <https://doi.org/10.1084/jem.179.2.709>
- Rhim, A. D., Mirek, E. T., Aiello, N. M., Maitra, A., Bailey, J. M., McAllister, F., Reichert, M., Beatty, G. L., Rustgi, A. K., Vonderheide, R. H., Leach, S. D., & Stanger, B. Z. (2012). EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell*, *148*(1-2), 349-361. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.025>
- Ribatti, D. (2017). The concept of immune surveillance against tumors. The first theories. *Oncotarget*, *8*(4), 7175-7180. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12739>
- Shacter, E., & Weitzman, S. A. (2002). Chronic inflammation and cancer. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, *16*(2), 217-226, 229; discussion 230-232.
- Shamas-Din, A., Kale, J., Leber, B., & Andrews, D. W. (2013). Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(4), a008714. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008714>
- Suzuki, M., Youle, R. J., & Tjandra, N. (2000). Structure of Bax: Coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell*, *103*(4), 645-654. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00167-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00167-7)
- Tsubata, T., Wu, J., & Honjo, T. (1993). B-cell apoptosis induced by antigen receptor crosslinking is blocked by a T-cell signal through CD40. *Nature*, *364*(6438), 645-648. <https://doi.org/10.1038/364645a0>
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*, *10*(8), 789-799. <https://doi.org/10.1038/nm1087>
- Waldhauer, I., & Steinle, A. (2008). NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene*, *27*(45), 5932-5943. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.267>
- Walsh, J. H., Karnes, W. E., Cuttitta, F., & Walker, A. (1991). Autocrine growth factors and solid tumor malignancy. *The Western Journal of Medicine*, *155*(2), 152-163.
- Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B., & Korsmeyer, S. J. (2001). Proapoptotic BAX and

- BAK: A requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5517), 727-730. <https://doi.org/10.1126/science.1059108>
- Willis, S. N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J. I., Adams, J. M., & Huang, D. C. S. (2005). Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes & Development*, 19(11), 1294-1305. <https://doi.org/10.1101/gad.1304105>
- Xin, M., & Deng, X. (2006). Protein phosphatase 2A enhances the proapoptotic function of Bax through dephosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(27), 18859-18867. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512543200>
- Xin, M., Gao, F., May, W. S., Flagg, T., & Deng, X. (2007). Protein kinase Czeta abrogates the proapoptotic function of Bax through phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(29), 21268-21277. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701613200>
- Yin, C., Knudson, C. M., Korsmeyer, S. J., & Van Dyke, T. (1997). Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature*, 385(6617), 637-640. <https://doi.org/10.1038/385637a0>
- Yin, X. M., Oltvai, Z. N., & Korsmeyer, S. J. (1994). BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature*, 369(6478), 321-323. <https://doi.org/10.1038/369321a0>
- Zakeri, Z., Quaglino, D., & Ahuja, H. S. (1994). Apoptotic cell death in the mouse limb and its suppression in the hammertoe mutant. *Developmental Biology*, 165(1), 294-297. <https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1255>
- Zhang, Y., Chen, X., Gueydan, C., & Han, J. (2018). Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell Research*, 28(1), 9-21. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.13>

Résumé

Introduction : Le cancer est une maladie caractérisé par une prolifération cellulaire anarchique, une perte de la différenciation et une absence de la mort cellulaire. *Bax* est un gène qui code la protéine Bax appartenant à la famille des protéines BCL2. Il est impliqué dans la régulation de la mort cellulaire apoptotique et il est fréquemment muté dans le cancer humain.

Objectif : Concevoir des amorces du gène *Bax* exprimé au cours de la maladie du cancer.

Matériels et méthodes : La conception de bonnes amorces passe par plusieurs étapes.

D'abord, la séquence du gène *Bax* a été prise à partir du site ENSEMBL. Ensuite, à travers le centre national de l'information biotechnologique (NCBI) et par l'utilisation de l'outil Primer blaste, les amorces spécifiques du gène *Bax* ont été conçues. Enfin, la paire d'amorces choisie et qui répond aux critères de choix de bonnes amorces a été vérifié par *in silico*-PCR.

Résultats : Parmi les 10 paires d'amorces spécifiques du gène *Bax* obtenues, nous avons choisi la première paire d'amorces répondant aux critères désirés.

Conclusion : Concevoir une bonne amorce est nécessaire à la réussite de la technique PCR et par conséquent permet l'amplification correcte du gène *Bax* et l'étude de son rôle dans l'immunité antitumorale.

Mots clés : Amorce, Apoptose, Bax, Cancer.

Abstract

Introduction: Cancer is a disease characterized by uncontrolled cell proliferation, loss of differentiation and absence of cell death. *Bax* is a gene, which encodes the Bax protein belonging to the BCL2 protein family, it is involved in the regulation of apoptotic cell death and is frequently mutated in human cancer.

Objective: Design primers for the *Bax* gene expressed in cancer disease.

Materials and methods: There are several steps to designing good primers.

First, the sequence for the *Bax* gene was taken from the ENSEMBL site. Then, through the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and through the use of the Primer blast tool, primers specific for the *Bax* gene were designed. Finally, the pair of primers chosen and which meets the criteria for choosing good primers was verified by *in-silico* PCR.

Results: Among the 10 pairs of primers specific for the *Bax* gene obtained, we chose the first pair of primers, because it meets the criteria for good primers.

Conclusion: Designing a good primer helps the PCR technique to succeed, and therefore the correct amplification of the *Bax* gene and the study of its role in cancer.

Keywords: Apoptosis, *Bax*, Cancer, Primer.

ملخص

المقدمة: السرطان يتميز بتكاثر الخلايا غير المنضبط وفقدان التمايز وغياب موت الخلايا. *Bax* هو جين يقوم بترميز بروتين *Bax* الذي ينتمي إلى عائلة BCL2 من البروتينات ، وهو يشارك في تنظيم موت الخلايا المبرمج وغالبًا ما يتطور في سرطان الإنسان.

الهدف: تصميم زوج من البرايمرز لجين *Bax* في مرض السرطان.

المواد والطرق: هناك عدة خطوات لتصميم بادئات جيدة.

أولاً، تم أخذ تسلسل جين *Bax* من موقع ENSEMBL. بعد ذلك، من خلال المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI) ومن خلال استخدام أداة Primer-BLAST، تم تصميم البرايمرز الخاصة بجين *Bax*. أخيرًا، تم التحقق من زوج البرايمرز المختارة والذي يلبي معايير اختيار البرايمرز الجيدة في *in-silico* PCR.

النتائج: من بين 10 أزواج من البرايمرز الخاصة بجين *Bax* التي تم الحصول عليها، اخترنا أول زوج من البرايمرز ، لأنه يفي بمعايير البرايمرز الجيدة.

الخلاصة: يساعد تصميم برايمرز جيد على نجاح تقنية PCR وبالتالي التضخيم الصحيح لجين *Bax* ودراسة دوره ضد السرطان.

كلمات البحث: موت الخلايا المبرمج، *BAX*، السرطان، البرايمرز.