



UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID TLEMCEN

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

Département de Biologie



LABORATOIRE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE APPLIQUEE ET IMMUNOLOGIE –
BIOMOLIM

**Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de MASTER en
Biologie**

Option: **IMMUNOLOGIE**

Présenté par Melle **BENMOUSSA GHIZLENE** et M. **BERRABAH NASREDDINE**

**Étude du génotype du gène *ENTPD1* (CD39), responsable
d'une réaction Pro-inflammatoire, chez les patients SEP:
Design d'amorces**

Soutenu le : 29/06/2022

Devant le Jury composé de :

Dr Wafa Nouari

Dr Nabila Brahami

Dr Frah Djelti

MCB.

MCA.

MCB.

Président

Encadreur

Examinatrice

Année Universitaire : 2021-2022

Remerciements

Tout d'abord, on remercie notre Dieu qui nous avons donné la puissance pour que nous puissions terminer ce travail.

Nous exprimons mes profondes gratitude et respectueuses reconnaissances à Mme Brahami Nabila pour son aide dans ce travail.

Nous tenons également à exprimer nos sincères remerciements à tous les enseignants qui contribuent à notre formation.

Enfin, nous tenons à remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail, ce qui est un honneur pour nous.

Dédicaces

À mon très cher père ; Tu as toujours été pour moi un exemple du père respectueux, honnête, de la personne méticuleuse, je tiens à honorer l'homme que tu es. Grâce à toi papa j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité. Je voudrais te remercier pour ton amour, ta générosité, ta compréhension... Ton soutien fut une lumière dans tout mon parcours. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi. Ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que tu as déployés pour mon éducation et ma formation. Je t'aime papa et j'implore le tout-puissant pour qu'il t'accorde une bonne santé et une vie longue et heureuse.

À ma très chère mère, affable, honorable , aimable , tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence , la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi, aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as pas cessé de me donner . Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien-être . Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour, puisse Dieu, le tout puissant , te préserver et t'accorder santé , longue vie et bonheur , Je t'aime maman .

À mes petites sœurs ; En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous , quoi que je fasse je ne peux pas récompenser vos sacrifices pour moi .

À ma binôme Ghizlène ; Tu étais toujours présente pour m'encourager, me remonter le morale et me donner d'espoir . Ainsi tes conseils précieux Ainsi à ma promotion et tous les étudiants de promotion M2 immunologie

Enfin merci à tous ce qui ont rendu possible ce travail, et même s'il ne se trouvent pas dans cette petite liste ; ils sont dans mes pensées

Nesreddine

Je dédie ce travail

À **ma très chère mère**, pour tous ses sacrifices, son amour, sa tendresse, son soutien pour me voir réussir et ses prières tout au long de mes études ;

À mon cher frère, **Oussama**, c'était la source de joie et de bonheur dans ma vie ;

À mon adorable frère, **Noureddine Messaoudi**, qui est mon mentor, il m'a beaucoup appris, me soutenir tout au long de mon parcours ;

à mes belles cousines, **Chahra Zad** et **Nesrine**

A mes meilleures amies, **Radja Chouel** et **Ikram Belazrag** ;

À mes enseignants Mme **Cherifa Benhamadi**, Mr **Mohamed Benhamadi** ; Mr **Zohir Bey** ;

Mr **Djilali Hrarssi** ;

À mes chères sœurs, **Amel, Chahinez, Laila, Asmaa, Djamila, Fatima, Asmaa, Kawther, Ikram** ;

Je ne peux pas clore cette liste sans citer les membres de **l'association Choumouaa Tlemcen**, ceux qui m'ont appris le sens du patriotisme, de la charité, du volontariat et de la solidarité...

À mon binôme **Nesreddine**, qui j'ai le plaisir de travailler avec vous.

Ghizlène

Table des matières

Remerciements.....	I
Dédicaces	II
Table des matières	IV
Liste des figures et des tableaux.....	VI
Liste des abréviations	VIII
Introduction.....	1

Chapitre 1: la sclérose en plaques

1- Généralité sur la sclérose en plaque	4
1.1. Historique.....	4
1.2. Définition	4
1.3. Epidémiologie	5
1.3.1. Fréquence et répartition dans le monde.....	5
1.3.2. En Algérie	6
2. Le système nerveux central (SNC).....	6
2.1. Les neurones	7
2.2. Les cellules gliales.....	8
2.3. La gaine de la myéline.....	8
2.3.1. La démyélinisation	9
3. Etiologie.....	10
3.1. Facteurs génétiques	10
3.1.1. Rôle de l'immunogénétique HLA.....	10
3.1.2. région non HLA	12
3.2. Des facteurs environnementaux	12
4. Les manifestations de la SEP	13
5. Immunopathologie de la SEP.....	14
5.1. Le rôle immunitaire	14

Chapitre 2 : Gène *ENTPD1*

1. Gène <i>ENTPD1</i> (CD39).....	17
1.1. Description.....	17
1.2. Structure.....	17

1.3.	Expression du gène.....	18
1.4.	Fonction	18
1.5.	Signalisation.....	19
2.	La sclérose en plaque et le CD39	20
3.	la PCR (Polymerase Chain Reaction).....	22
3.1.	Définition	22
3.2.	Fonctionnement de la PCR	22
3.3.	Les étapes.....	22
3.4.	Analyse du production PCR.....	23
3.5.	Les types de la PCR.....	24
3.6.	Conception des amorces pour la PCR	24

Chapitre 3: Matériels et méthode

1.	Matériels et méthodes.....	26
1.1.	Objectif	26
1.2.	But	26
1.3.	La séquence du gène ENTPD1	26
1.4.	L'amorce spécifique du gène ENTPD1	27
1.5.	Résultats de primer blast.....	29
1.5.1.	Choix de la paire d'amorces :	29
1.6.	Interprétation des résultats	31
1.7.	Confirmation des résultats	31
	Conclusion	32
	Références bibliographiques	33
	Résumé	37

Liste des figures et des tableaux

Liste des figures

Figure1 : Image IRM en fausses couleurs d'un hémisphère cérébral de personne atteinte de sclérose en plaques (les zones lésées sont en rouge).

Figure 2 : La géographie de la sclérose en plaques prévalence dans le monde

Figure3 : Schéma du système nerveux central

Figure 4 : Schéma d'un neurone

Figure 5 : Les effets du démyélinisation sur des impulsions de nerf

Figure 6 : Localisation de la région HLA sur le chromosome 6

Figure 7 : Quelques manifestations cliniques

Figure 8 : la physiopathologie de la SEP

Figure9: Différenciation des LT CD4+ naïfs en fonction des cytokines

Figure10 : La position du *ENTPDI* sur le chromosome 10

Figure11 :Le schéma réactionnel de la ENTPDase.

Figure 12 : Illustration de la fonction de CD39 et de la signalisation ATP/ADO

Figure 13 : Illustration du la technique d'amplification de l'ADN par PCR

Figure 14 : La base de données "Ensembl"

Figure15: La séquence de gène *ENTPDI*

Figure 16 : L'outil Primer BLAST

Figure 17: La numération des bases

Figure 19:Vu graphique des résultat (paires d'amorces)

Figure 20 : Choix de la paire 3 parmi les résultats de primer BLAST

Figure 21: Position des amorces directe et inverse dans la séquence de l'exon 3 du gène

Liste des tableaux

Tableau 1 : Résultats de la conception d'amorces

Liste des abréviations

A : adénine

ADN : Acide désoxyriboncléique

ADO : Adénosine

ADP : Adénosine diphosphate

AMP : Adénosine momophosphate

ATP : Adénosine triphosphate

BHE : Barrière hémato-encéphalique

C : Cytosine

CD : Cluster de différenciation

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

ENTPD1 : Ecto-nucléoside triphosphate diphosphohydrolase catalyse l'hydrolyse 1

Fox P3 : Forkhead box p3

G : **Guanine**

HLA : Human leukocyte antigen

IL : L'Interleukine

IRM : Imagerie par résonance magnétique

IFN : L'interféron

MAG : Glycoprotéine associée à la myéline

MOG : Glycoprotéine myélinique oligodendrocytaire

NCBI : National Center for Biotechnology Information

NTPDase : Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase

PBM : Protéine basique de la myéline

PBMC : Cellules mononucléaires du sang périphérique

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

Pd : Paire de base

Pi: phosphate inorganique

PLP : Protéine protéolipidique

SNC : Système nerveux central

SEP-RR: Sclérose en plaque récurrentte-rémittente

SEP : Sclérose en plaques

T : Thymine

T-reg : T-régulateur

TGF: Facteur de croissance transformant

Th : T-helper

TNF: Facteur de nécrose tumorale

Introduction

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire et neurodégénérative chronique du système nerveux central (SNC). Elle se caractérise par des lésions démyélinisantes multifocales du cerveau et de la moelle épinière. (Fondation Charcot stichting, 2015).

Bien que les origines de la maladie ne soient pas entièrement comprises, nous savons maintenant combien de types de cellules du système immunitaire sont impliquées dans la SEP. Généralement, le système immunitaire assure la surveillance de l'organisme et la protection contre les agents pathogènes. Dans la SEP, le système immunitaire attaque les cellules du système nerveux central. (Fondation Charcot stichting, 2015)

Elle touche environ 2,5 millions de personnes dans le monde, principalement des jeunes à prédominance féminine. Elle représente la première cause de dysfonctionnement neurologique non traumatique chez l'adulte jeune. (Milo & Kahana, 2010)

La physiopathologie de la SEP reste inconnue. Il est impliqué dans les mécanismes immunopathologiques ciblant les antigènes de la myéline au sein du système nerveux central.

En conditions normales, l'ensemble des réactions immunitaires est contrôlé par une population de cellules spécialisées appelées lymphocytes T régulateurs (Treg). Le rôle des lymphocytes Treg est d'empêcher que le système immunitaire n'attaque les cellules de l'organisme. (Fondation Charcot stichting, 2015) Les lymphocytes Treg exercent leur fonction suppressive par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes. Ils peuvent notamment influencer les cellules effectrices pro-inflammatoires par contact direct, par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires ou encore grâce aux protéines exprimées à leur surface. Parmi ces protéines de surface, la molécule CD39 est une enzyme dont la fonction est de dégrader l'ATP (adénosine triphosphate) extracellulaire. (Fondation Charcot stichting, 2015) Ceci empêche la transmission de multiples signaux pro-inflammatoires par l'ATP. Chez les patients souffrant de SEP, bien que la fréquence des lymphocytes Treg ne soit pas modifiée, il semble que leur fonction suppressive est, par conséquent, leur capacité à réguler une réponse pro-inflammatoire soit altérée. (Fondation Charcot stichting, 2015)

La PCR est largement utilisée dans divers domaines cliniques et scientifiques. Les tests basés sur la PCR effectuent des études qualitatives et quantitatives génomiques complexes de

manière sensible et rapide (Katia & Gilbert, 2007). Dans le développement de la PCR, le choix des amorces est essentiel pour une amplification efficace.

Dans cette optique, cette étude vise à concevoir des amorces pour le gène *ENTPDI* dont la protéine est responsable d'une réaction pro-inflammatoire. Afin de mener plus tard une étude cas-témoin visant à trouver un variant associé aux sujets atteints de SEP.

**Etude
bibliographique**

1- Généralité sur la sclérose en plaque

1.1. Historique

C'est Jean Martin Charcot, neurologue français à la clinique de la Salpêtrière, qui en 1868, a donné la première description précise de la sclérose en plaques et de sa évolution. (Papeix, 2011)

La maladie n'est pourtant pas nouvelle (autres cas connus : une femme du peuple Viking, Lidwine de Schiedam au XIV^e siècle, Auguste d'Este). Le système nerveux fut décrit pour la première fois en 1824. (Papeix, 2011)

La sclérose en plaques est mentionnée pour la première fois par les termes «sclérose en île », dans l'ouvrage « Anatomie pathologique du corps humain », écrit par Jean Cruveilhier (1791–1874), chirurgien français. Puis dans l'atlas «Pathological anatomy » de l'écossais Robert Carswell (1793-1857) en 1838 dans lequel sont dessinées les lésions de la moelle épinière (Papeix, 2011)

1.2. Définition

la sclérose en plaques (SEP) est une pathologie dégénérative chronique du système nerveux central causé par un processus inflammatoire à médiation immunitaire .

Il s'agit de la maladie neurologique la plus fréquente du sujet jeune d'évolution rémittente ou progressive. Elle est responsable d'un handicap qui est fonction de la localisation des plaques avec une atteinte sensorimotrice, mais également cognitive, génito-sphinctérienne. La fatigue est un des principaux symptômes. La symptomatologie est variable d'un cas à l'autre. (Gallien, Benoit, & Albane, 2012)

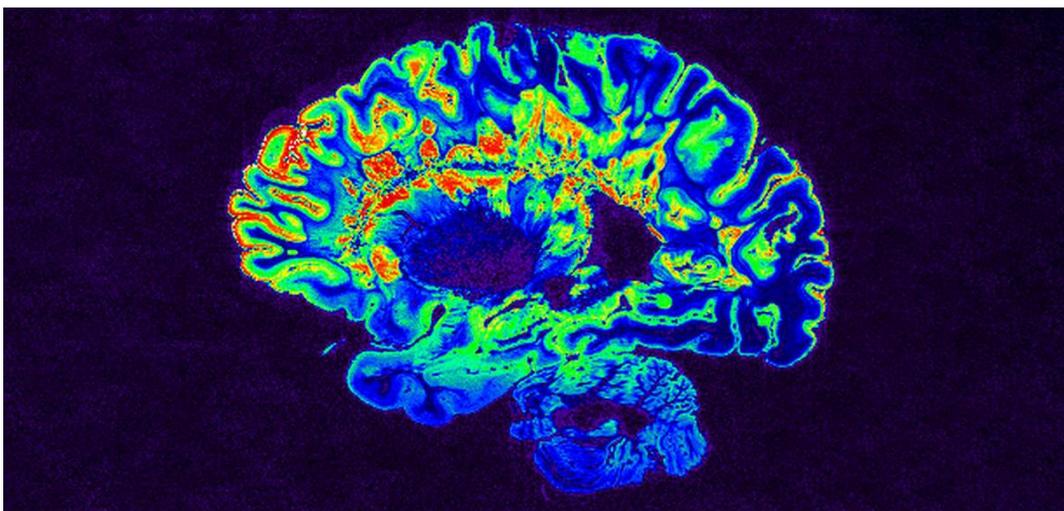


Figure1 :Image IRM en fausses couleurs d'un hémisphère cérébral de personne atteinte de sclérose en plaques (les zones lésées sont en rouge). (Koppe, 2022)

1.3. Epidémiologie

1.3.1. Fréquence et répartition dans le monde

La sclérose en plaques touche environ 2,5 millions de personnes dans le monde. L'incidence varie selon la zone géographique. (polet, et al., 2019)

La maladie est inégalement répartie dans le monde : sa prévalence varie entre 5 cas pour 100000 personnes dans les régions tropicales ou en Asie et 100-200 cas pour 100 000 dans les régions tempérées, en particulier celles qui comptent de grandes populations d'origine nord-européenne, notamment les États-Unis, le Canada, la Nouvelle-Zélande et certaines parties de l'Australie.(figure 2) (Milo & Kahana, 2010)

il existe des poches où la fréquence de la SEP est élevée, comme en Sardaigne, dans la région méditerranéenne chaude et méridionale ,tandis que chez les Inuits vivant dans le froid et le nord du Canada, la fréquence de la SEP est faible. (Granieri, Casetta, Govoni, MR, & Marchi, 2000)

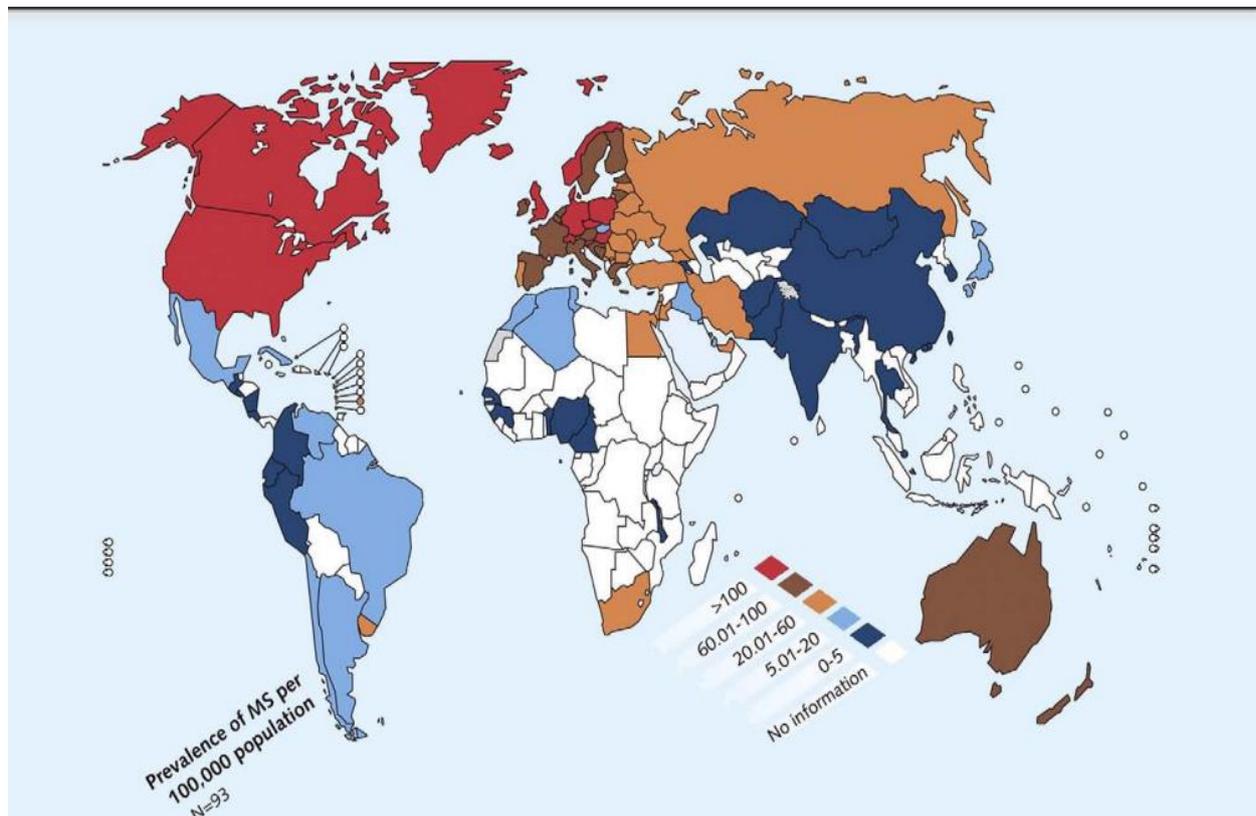


Figure 2 : La géographie de la sclérose en plaques prévalence dans le monde. (Milo & Kahana, 2010)

1.3.2. En Algérie

Selon de multiples études concordantes réalisées sur les 15 dernières années, il s'est avéré que la prévalence de la sclérose en plaques est en nette augmentation en Algérie.

Il y'aurait entre 15 000 et 17 000 malades sur les 15 dernières années , soit environ 1 200 nouveaux annuellement (business france)

Des études effectuées en Algérie montre que les patients maghrébins en général et algériens en particulier ont la forme la plus sévère de la maladie, considérée comme la seconde cause de handicap après les accidents de la route. « La forme sévère de la sclérose en plaques évolue très vite vers le handicap, ce qui nécessite une prise en charge précoce » (APIDPM, 2021)

2. Le système nerveux central (SNC)

Le système nerveux central (SNC) comprend le cerveau et la moelle épinière (figure3) . Le cerveau contrôle la plupart des fonctions corporelles, y compris la perception, le mouvement, la sensation, la pensée, la parole et la mémoire. La moelle épinière se connecte au cerveau au niveau du tronc cérébral et est protégée par les vertèbres qui composent la colonne vertébrale. Les nerfs émergent de la moelle épinière et innervent les deux côtés du corps. La moelle épinière transporte des signaux nerveux qui leur permettent de faire des allers-retours entre les nerfs du cerveau et d'autres parties du corps. (Lee, 2020)

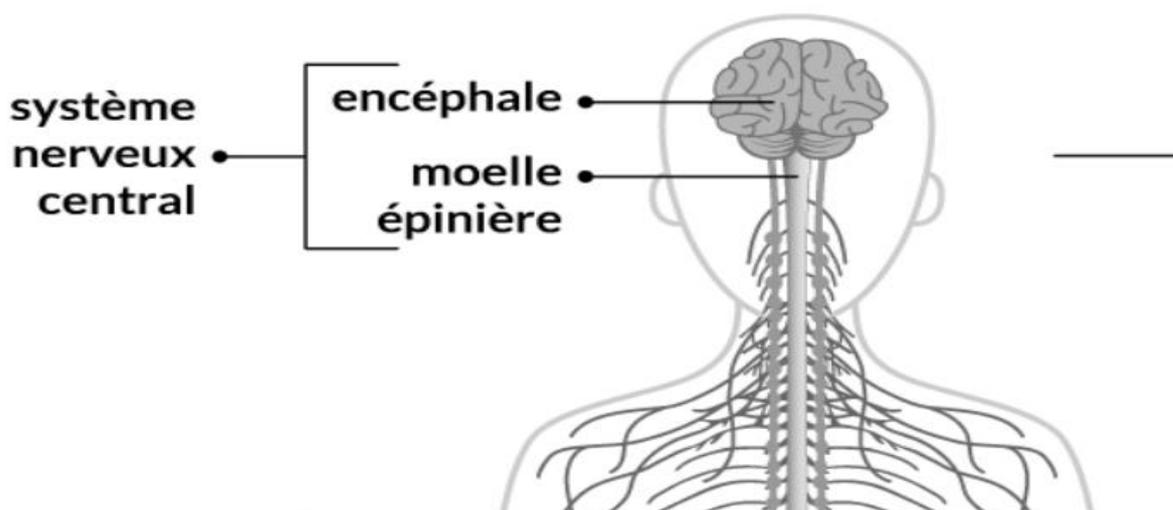


Figure3 : Schéma du système nerveux central (Lee, 2020)

Le système nerveux central contient essentiellement deux principaux types de cellules :

- Les neurones
- Les cellules gliales

2.1. Les neurones

Les neurones sont les unités de travail de base du cerveau. C'est une cellule spécialisée conçue pour transmettre des informations à d'autres cellules nerveuses, cellules musculaires et cellules glandulaires. Les caractéristiques du cerveau reposent en grande partie sur les propriétés structurelles et fonctionnelles des interconnexions entre les neurones. Ils sont extrêmement nombreux : environ 100 milliards par individu.

Le neurone se compose de trois parties (figure 4) :

- Le corps cellulaire (soma) : contient le noyau et le cytoplasme
- Les axones : partent du corps cellulaire et forment généralement de nombreuses petites branches avant de se terminer au terminal nerveux
- Les dendrites : partent du corps cellulaire et reçoivent des informations provenant d'autres neurones.

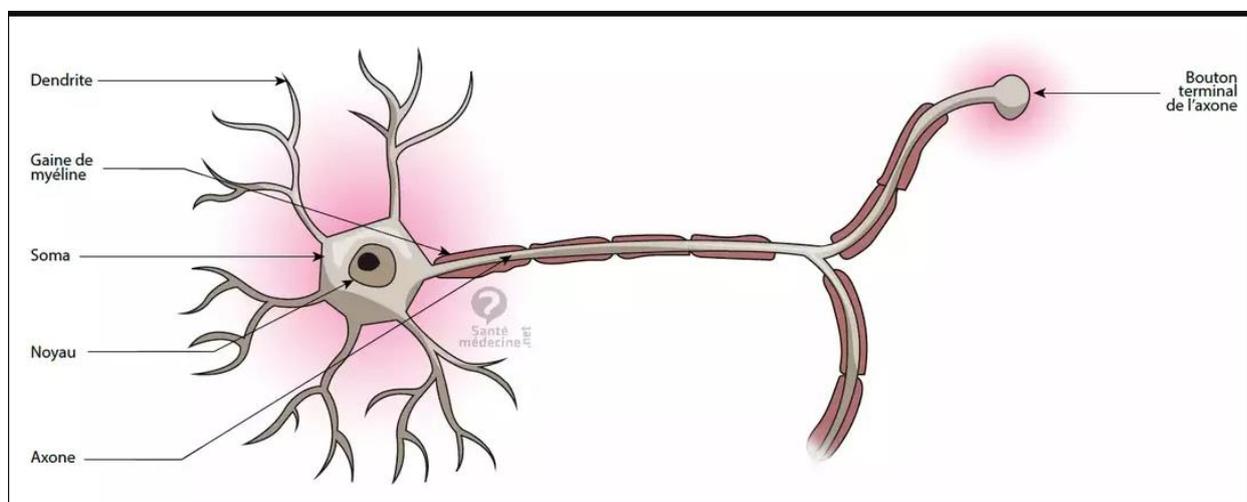


Figure 4 : Schéma d'un neurone (sante-medecine.net, 2022)

2.2. Les cellules gliales

Les cellules gliales sont les tissus de soutien du système nerveux central. Ils assurent les connexions aux vaisseaux sanguins, apportent les nutriments nécessaires au fonctionnement métabolique du système nerveux, éliminent les cellules mortes et combattent les agents pathogènes. (Fanny, 2009) Ces cellules sont capables de se reproduire au cours de leur vie. Il existe généralement 4 principaux types de cellules gliales :

- **Les astrocytes:** ce sont les cellules les plus nombreuses du parenchyme cérébral. Elles ont une forme étroite, leur prolongement qui entourent les capillaires sanguins forment avec l'endothélium des capillaires la barrière hémato-encéphalique. (Fanny, 2009)
- **Les cellules épendymocytes:** ce sont des cellules épithéliales tapissant les ventricules cérébraux et le canal de l'épendyme de la moelle épinière. Elles jouent un rôle important dans les échanges entre le liquide céphalo-rachidien et les parenchymes cérébraux.
- **Les microglies:** ce sont les macrophages du SNC qui ont un rôle de phagocytose vis à vis des éléments étrangers et des cellules mortes. (Fanny, 2009)
- **Les oligodendrocytes:** leur rôle principal est l'élaboration de la gaine de myéline des neurones indispensable à la vitesse de conduction (Fanny, 2009)

2.3. La gaine de la myéline

La gaine de myéline est une membrane qui isole chaque nerf du cerveau et de la moelle épinière, comme une gaine en plastique autour des fils électriques. C'est cette coque protectrice qui assure la conduction normale des informations nerveuses d'une partie du corps à l'autre. La conduction rapide de l'influx nerveux le long des voies nerveuses est essentielle pour la plupart des fonctions motrices, sensorielles et intégratives des systèmes nerveux central (cerveau, cervelet et moelle épinière) et périphérique (nerf). (La myéline, 2019)

La myéline est une matière grasseuse essentielle, composée de 70% de lipides (cholestérol, phospholipides et glycolipides) et 30% de protéines (PLP, MBP, MAG, MOG). (Fanny, 2009)

La myéline formée par les oligodendrocytes. Un oligodendrocyte déploie jusqu'à 40 feuillettes membraneux qui s'enroulent chacun étroitement autour d'un axone pour former un segment de myéline. (Fanny, 2009)

2.3.1. La démyélinisation

On parle de démyélinisation en présence de modifications anormales de la myéline. Lorsque cette enveloppe est endommagée, les conséquences sont très évidentes et potentiellement dramatiques. En conséquence, la vision, l'ouïe, la parole, la motricité ou la mémoire peuvent être perturbées ou paralysées. Dans de nombreux cas, on craint une paralysie complète ou une mort prématurée. (La myéline, 2019)

Un seul type de myéline est affecté :

- La myéline du système nerveux central, comme dans certaines leucodystrophies et **la sclérose en plaques**.
- La myéline du système nerveux périphérique.

Les deux types de myéline sont rarement affectés.

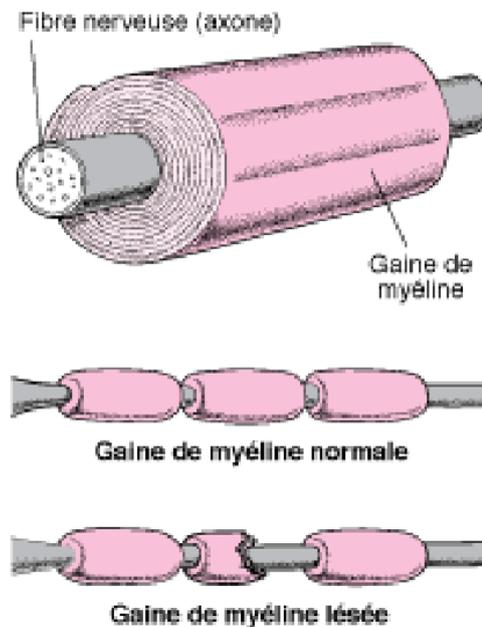


figure 5 : Les effets du démyélinisation sur des impulsions de nerf (Michael C. Levin, 2021)

3. Etiologie

Bien que Charcot ait décrit la sclérose en plaques il y a un siècle et demi, la cause de ce trouble du système nerveux central reste inconnue.

3.1. Facteurs génétiques

La sclérose en plaques (SEP) n'est pas une maladie héréditaire. mais il existe une prédisposition génétique, c'est-à-dire facteurs génétiques qui favorisent son apparition. Il s'agit alors d'une condition dont l'origine est multifactorielle (génétique et environnementaux). (Inserm, 2017)

Ce qu'il faut voir, c'est que plus le partage de matériel génétique est important avec le membre de la famille atteint, plus le risque de développer la SEP augmente. Par exemple, si un vrai jumeau est atteint de la SEP, son jumeau a un risque fort de développer la maladie. (Brassat, 2010) Puis, le risque décroît, jumeaux hétérozygotes, frères et sœurs, demi-frères et de façon intéressante, lorsque le membre de la famille qui est atteint de la maladie est un enfant adopté, alors les autres membres de la famille ne présentent pas plus de risque que la population générale. Ces données montrent bien qu'il existe une augmentation du risque dans les familles où un des membres est atteint, mais cette augmentation du risque est relative et une fois de plus doit être confrontée aux facteurs d'environnement. Sans facteurs d'environnement : pas de SEP. (Leila & Smail, 2018)

Depuis les années 1970, lorsque les haplotypes HLA (human leukocyte antigen) sont associés à le risque de SEP a été identifié, plusieurs études génétiques ont été lancées et des gènes ont été clairement associés avec la SEP. (Leila & Smail, 2018)

3.1.1. Rôle de l'immunogénétique HLA

Les antigènes peptidiques, pour être reconnus par les lymphocytes T, doivent d'abord rendre accessibles les récepteurs antigéniques présents à la surface des lymphocytes T (TCR). MCH assurent la fonction de présentation de l'antigène (peptide). Ce sont des glycoprotéines membranaires qui fournissent au système Immunité à une différenciation soi-non-soi. Les gènes codant pour ces protéines sont situés dans bras court du chromosome 6. (labalette, bahram, & béné)

Le CMH est subdivisé en 3 régions :

- La région CMH de classe I comprend 3 gènes HLA de classe I, HLA-A, HLA-B, HLA-C
- La région CMH de classe II comprend 3 paires de gènes HLA de classe II, HLA-DP (gènes DPA et DPB), HLA-DQ (DQA et DQB) et HLA-DR (DRA et DRB1)
- La région III, située entre les régions I et II, ne renferme pas de gènes intervenant dans la présentation antigénique. Elle contient des gènes codant pour des protéines du système du complément (C2, C4, facteur B), pour le TNF et pour les lymphotoxines. (labalette, bahram, & béné)

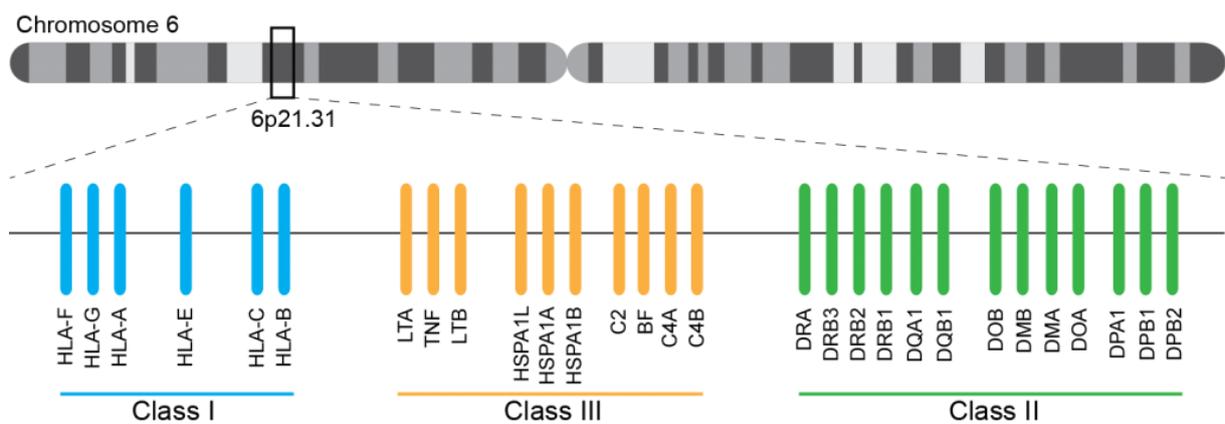


figure 6 : Localisation de la région HLA sur le chromosome 6 (Le typage HLA à l'ère du séquençage à haut-débit, 2014)

Il a ainsi été bien démontré que les gènes de l'haplotype HLADR15 (plus particulièrement HLADR-B1*1501) augmentent le risque relatif de SEP de 2 à 4 fois. Cette susceptibilité est liée au fait que ce type de HLA est capable de lier un auto-antigène de la myéline avec une grande affinité, accroissant ainsi la réponse des cellules T auto-immunes. (Brigitte, 2012)

HLADRB1*15 a été associé de manière significative avec un phénotype féminin et un début précoce dans plusieurs études, et ce dans toutes les formes cliniques (RR, SP ou PP). La fréquence de cet haplotype est effectivement beaucoup plus élevée chez les patientes atteintes de SEP que chez les malades masculins. (Brigitte, 2012)

Par contre, l'haplotype HLADRB1*04 pourrait avoir un effet protecteur contre l'inflammation et diminuer le risque de poussée. (Brigitte, 2012)

Les allèles HLA pourraient dès lors influencer le risque et la durée de la phase inflammatoire de la maladie. Leur influence est très probable, bien que non encore clairement démontrée. (Brigitte, 2012)

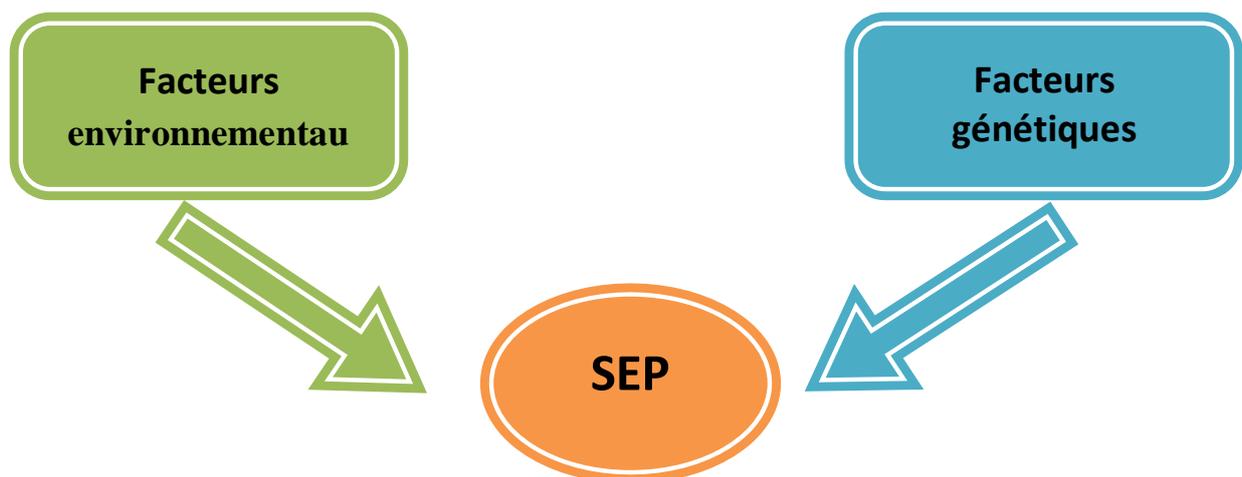
3.1.2. région non HLA

D'autres gènes de réponse immunitaire sont maintenant bien établis, récepteur de l'interleukine 2, récepteur de l'interleukine 7, tyrosine kinase (TYK2), récepteur du facteur de nécrose tumorale (TNF) (Michiels, 2018). La liste peut s'allonger en fonction de la reproduction (réplication) de l'étude génétique. Ces gènes codent tous pour des protéines immunitaires. Le système HLA peut n'avoir qu'un effet génétique de 40 %. Le rôle des autres gènes dans la susceptibilité est faible, car les porteurs de l'allèle de susceptibilité n'ont qu'un risque accru de 1,3 à 1,5 fois. Cela suggère donc qu'il existe de nombreux gènes, chacun ayant un rôle faible. (Michiels, 2018)

Certains des gènes impliqués ne sont pas directement liés à la réponse immunitaire, par exemple le gène KIF1b est une protéine axonale, que l'on pense être une réponse immunitaire dans la SEP contre les composants du système nerveux sur la gaine de myéline et les axones. (Michiels, 2018)

3.2. Des facteurs environnementaux

Les études épidémiologiques ne peuvent identifier aucun facteur environnemental qui contribue à la maladie. Une carence en vitamine D peut être un déclencheur, mais son implication n'a pas été définitivement prouvée. De nombreux virus ont également été étudiés, en supposant que les infections virales acquises dans la petite enfance peuvent être à l'origine de maladies dans des populations génétiquement prédisposés. (Passeport sante, 2012)



4. Les manifestations de la SEP



figure 7 : quelques manifestations cliniques (dysfonction erectile, 2015)

Généralement, la SEP débute par un ou plusieurs symptômes en même temps. Les symptômes varient d'une personne à l'autre, en fonction de la localisation de la plaque dans le système nerveux central et de la forme évolutive de la maladie. Les symptômes peuvent également varier dans le temps chez une même personne. (Mieux vivre avec la SEP, 2017)

La diversité des symptômes de la SEP s'explique par le fait de l'inflammation qui peut survenir dans n'importe quelle région du système nerveux central. Par conséquent, les symptômes de la maladie dépendent de la zone du cerveau ou de la moelle épinière touchée.

Les symptômes les plus courants sont :

- **Troubles de la sensibilité** (fourmillements, sensation de brûlure, de décharges électriques, engourdissement...)
- **Troubles visuels** (vision floue, double ou instable)
- **Troubles moteurs** (faiblesse ou raideur musculaire des membres),
- **Troubles de l'équilibre ou de la marche** (vertiges, troubles de la coordination des mouvements).

5. Immunopathologie de la SEP

Les maladies auto-immunes sont dues à un dérèglement du système immunitaire qui s'attaque à certains composants de l'organisme. Dans la sclérose en plaques, il existe une réaction immunitaire inappropriée qui considère la myéline comme un corps étranger et provoque une inflammation. (Inserm, 2017)

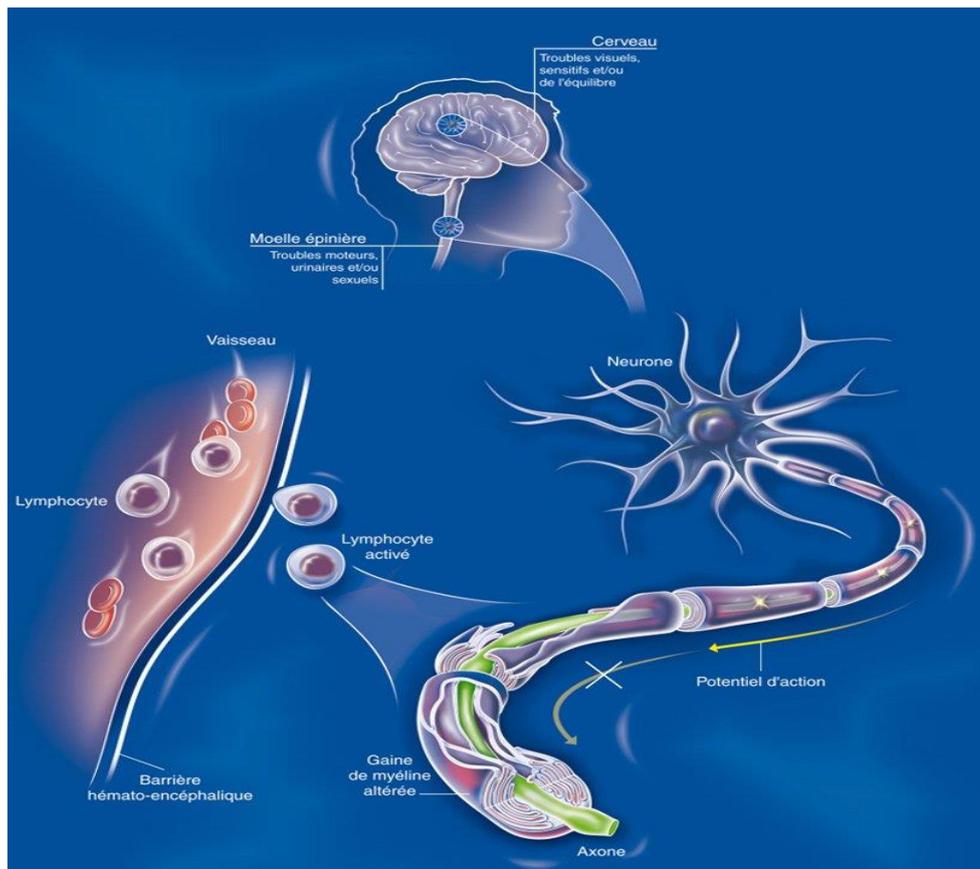


figure 8 : la physiopathologie de la SEP (Inserm, 2017)

5.1. Le rôle immunitaire

le système immunitaire se dérègle et développe une réponse dirigée contre la myéline (démélinisation). Il est probable qu'une des cibles de l'attaque immunitaire soit une composante de la myéline dans le système nerveux central. (Brochet, 2010)

La phase initiale de la lésion de démélinisation est caractérisée par une rupture de la **barrière hémato-encéphalique** et par une infiltration des lymphocytes et des monocytes activés d'origine sanguine. Les premiers mouvements de la maladie ne se situe

donc pas au niveau du système nerveux central mais bien au niveau systémique. (Brigitte, 2012)

Rappelons que la plupart des cellules de la cascade immunitaire peuvent être impliquées dans cette maladie. Il n'en reste pas moins qu'il existe des acteurs majeurs tels que les lymphocytes T CD4, les lymphocytes T régulateurs, les lymphocytes T CD8, les lymphocytes B ou encore les macrophages. (David, 2010)

Dans le compartiment périphérique, les lymphocytes **T CD4+** (LT CD4) , sont stimulés par la présentation d'un exo-antigène dont la structure est proche d'un auto-antigène de la myéline, par les cellules dendritiques , ou cellule présentatrice d'antigène, par le biais d'un complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH II). (Brigitte, 2012) .

Leur rôle est essentiel pour la différenciation des lymphocytes T CD4+ naïfs en lymphocytes T auxiliaires : Th1, Th2, Th17 ou cellules T-reg. La fonction de ces cellules est altérée, avec une sécrétion anormale de cytokines pro-inflammatoires. (Karni, 2006)

Les cellules CD4+ naïves activées en présence de molécules co-stimulatrices telles que le CD28 , peuvent se différencier en 3 lignées de **lymphocytes T auxiliaires : Th1, Th2, Th17**. Ces cellules produisent différentes cytokines et ont différentes fonctions immunomodulatrices :

- 3 **Les cellules Th1** produisent de l'IFN γ , qui régule la présentation de l'antigène en favorisant la présentation de l'antigène et l'immunité cellulaire.
- 4 **Les cellules Th2** sécrètent les cytokines IL4, IL5, IL13 qui régulent les réponses des cellules B.
- 5 **Les cellules Th17** expriment IL17, IL17F, IL21, IL22 et IL26. Ils régulent les réponses inflammatoires. Ces cellules Th17 sont mises en évidence dans les lésions de SEP. (Karni, 2006)

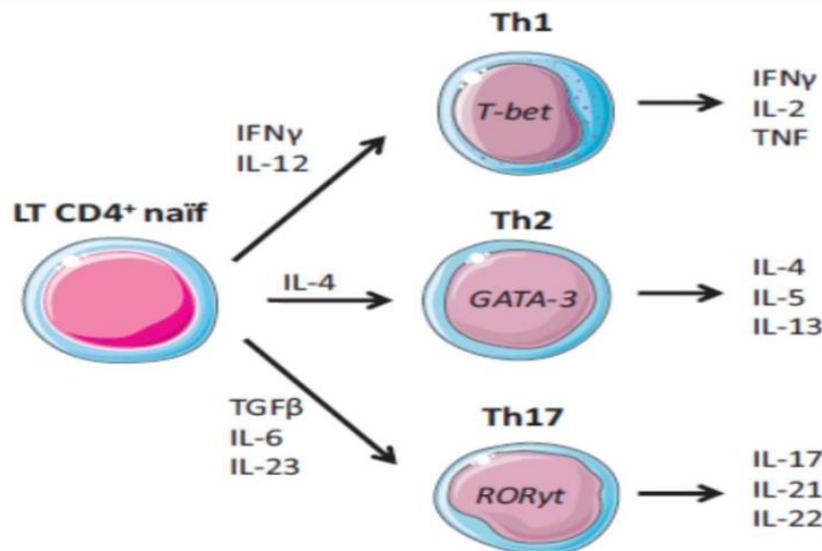


Figure9: Différenciation des LT CD4+ naïfs en fonction des cytokines (Salou M., 2013)

Une autre classe de LT CD4+ importants dans la SEP sont les cellules T-reg. Ils sont des lymphocytes T CD4+ dérivés du thymus caractérisés par l'expression du marqueur extracellulaire CD25 et du facteur de transcription FoxP3. (Fletcher, Lalor, Sweeney, & Tubridy, 2010)

Les cellules T régulatrices contrôlent la prolifération d'autres cellules T effectrices. Ils sont nécessaires au maintien de la tolérance immunitaire, c'est-à-dire qu'ils permettent la tolérance des auto-antigènes et des antigènes non dangereux. (Fletcher, Lalor, Sweeney, & Tubridy, 2010) Ils inhibent également l'action des lymphocytes T effecteurs en fin de réponse immunitaire. Ainsi, si les Tregs sont déficients, la tolérance immunitaire n'est plus assurée, et les lymphocytes T effecteurs peuvent attaquer les antigènes de leurs propres cellules et provoquer des maladies auto-immunes. Dans le sang des patients atteints de SEP récurrente-rémittente, une diminution de la capacité suppressive et de l'expression de Fox P3 de ces cellules a été observée. (Venken K., 2008)

La sclérose en plaques est aussi une maladie du lymphocyte B, comme en témoigne de façon la plus éclatante, la présence du profil oligoclonal dans le liquide céphalorachidien. (David, 2010) Il existe d'autres arguments, notamment anatomopathologiques et la classification du Lucchinetti définit le groupe 2 où la maladie est essentiellement méditée par la présence d'anticorps et du complément. Le lymphocyte B et l'immunité humorale sont la cible des traitements ciblant la molécule CD20 exprimé sur les LB (rituximab et les molécules humanisées). (David, 2010)

1. Gène *ENTPD1* (CD39)

1.1. Description

L'*ENTPD1* pour **Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1** ou CD39 (pour cluster de différenciation 39) est une enzyme dont le gène est le *ENTPD1* situé sur le chromosome 10 humain, contrôle les concentrations de nucléotides extracellulaires via l'hydrolyse des nucléosides tri- et diphosphates. (Munkonda, 2007)

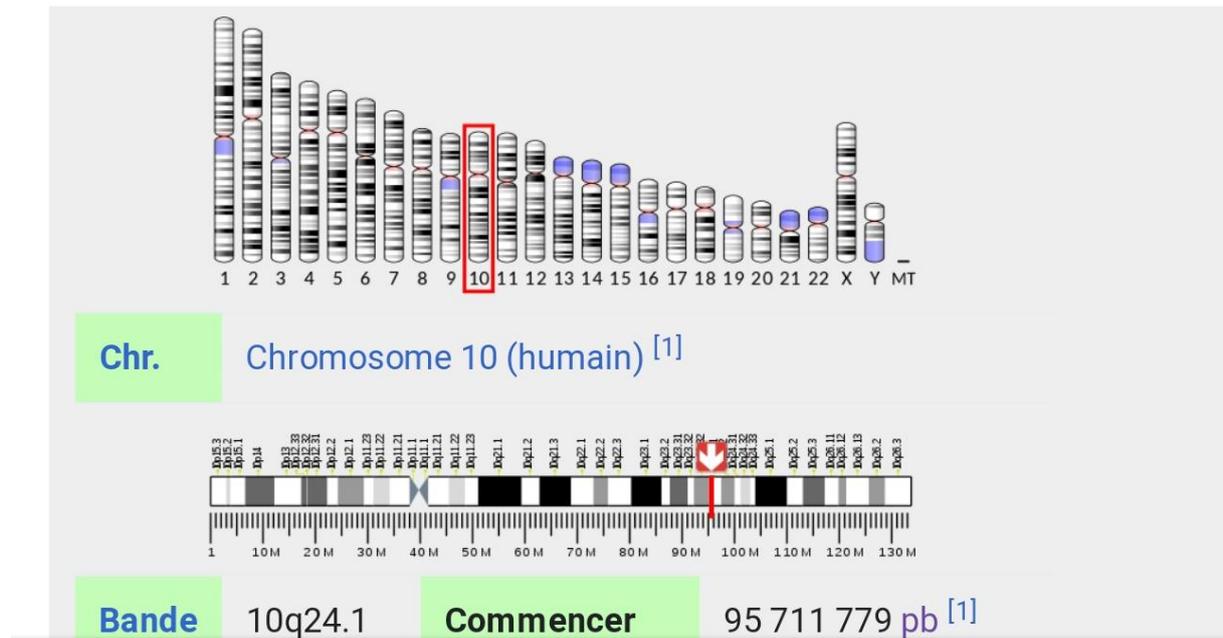


Figure10 : la position de l'*ENTPD1* sur le chromosome 10

La famille ENTDPase se compose de 8 enzymes localisées à la fois au niveau intracellulaire (ENTPDase4,5,6,7) et extracellulaire (ENTPDase-1, 2, 3, 8). Nous nous concentrons ici sur le membre de la famille ENTDPase-1 localisé à la surface cellulaire. (Atara, et al., 2017)

1.2. Structure

CD39 est une protéine membranaire intégrale, la protéine CD39 humaine est constituée de **510 acides aminés**, avec une **masse moléculaire de 70 à 100 KDa**. La séquence d'acides aminés du CD39 humain présente une identité de 77 % et 75 % avec celle du CD39 de souris et de rat, respectivement. (C.R. Maliszewski, 1994)

Structurellement, le CD39 est constitué de deux régions structurales transmembranaires, d'un petit domaine cytoplasmique et d'un grand domaine hydrophobe extracellulaire. La région

extracellulaire contient des régions conservées par l'apyrase, ce qui est nécessaire pour maintenir l'activité enzymatique et l'intégrité structurale. (C.R. Maliszewski, 1994)

1.3. Expression du gène

L'expression du CD39 peut être régulée par les cytokines pro-inflammatoires, comme l'interféron (IFN), le facteur de croissance transformant- β (TGF- β), la prostaglandine E2, l'interleukine-1 β (IL-1 β) et le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α), et des processus comme l'hypoxie ou la production de stress oxydatif. (Jianru, Zhaochen, Yuzhong, & Huabao, 2020)

1.4. Fonction

L'ecto-nucléoside triphosphate diphosphohydrolase catalyse l'hydrolyse des résidus γ - et β -phosphate des nucléotides, bien qu'à des degrés différents d'efficacité. CD39 a été initialement décrite comme un marqueur d'activation des cellules lymphoïdes. Un nombre croissant d'études ont démontré que CD39 est une NTPDase dominante dans les tissus/cellules immunitaires et joue un rôle important dans la régulation de l'immunité innée médiée par l'ATP en réduisant les niveaux d'ATP pro-inflammatoire dans l'espace extracellulaire. (Li, Chen, Wang, Li, Feng, & Sun, 2019)

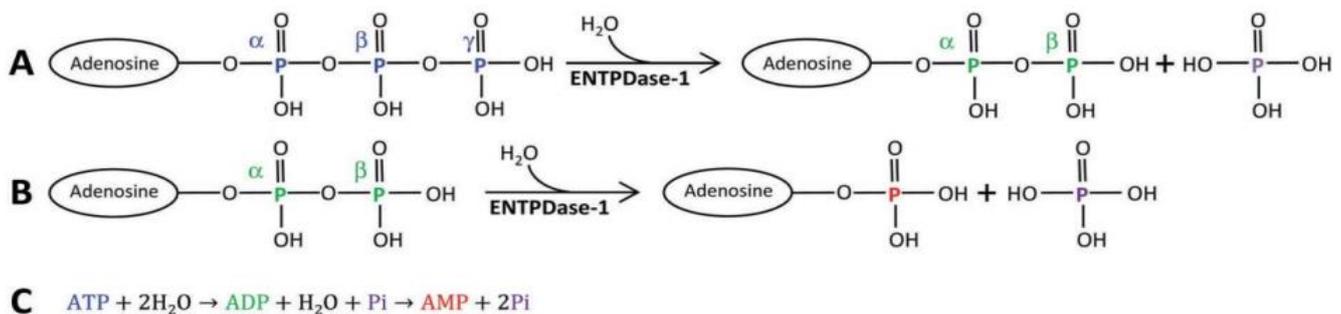


Figure11 :Le schéma réactionnel de la ENTPDase.

- Hydrolyse de l'ATP en ADP et Pi
- Hydrolyse de l'ADP en AMP et Pi.
- Schéma stœchiométrique des réactions présentées en (A) et (B).

L'adénosine triphosphate extracellulaire (eATP) intervient dans les réponses pro-inflammatoires en recrutant et en activant les cellules inflammatoires. (Jianru, Zhaochen,

Yuzhong, & Huabao, 2020) Le CD39 peut hydrolyser l'eATP en adénosine monophosphate (AMP), tandis que le CD73 peut convertir l'AMP en adénosine (ADO), un nucléoside immunosuppresseur. Le CD39 est une enzyme limitant la vitesse de cette cascade, qui est considérée comme un commutateur immunologique faisant passer d'un environnement pro-inflammatoire médié par l'ATP à un statut anti-inflammatoire. (Jianru, Zhaochen, Yuzhong, & Huabao, 2020)

L'expression du CD39 peut être détectée dans un large éventail d'immunocytes tel que : les CD4+ ainsi que par les sous-ensembles de cellules T régulatrices (Treg) , CD8+ ,Th17, LB, neutrophiles, les cellules dendritiques , macrophages, les plaquettes et une faible expression dans les cellules NK. (Jianru, Zhaochen, Yuzhong, & Huabao, 2020) Cette expression est sous l'influence de facteurs environnementaux et génétiques. Il est de plus en plus suggéré que le CD39 participe à certains processus physiopathologiques, comme les maladies inflammatoires de l'intestin (MII), la septicémie, **la sclérose en plaques (SEP)**, les maladies allergiques, les lésions d'ischémie-reperfusion (I/R), le lupus érythémateux systémique (LES), le diabète et le cancer. (Jianru, Zhaochen, Yuzhong, & Huabao, 2020)

1.5. Signalisation

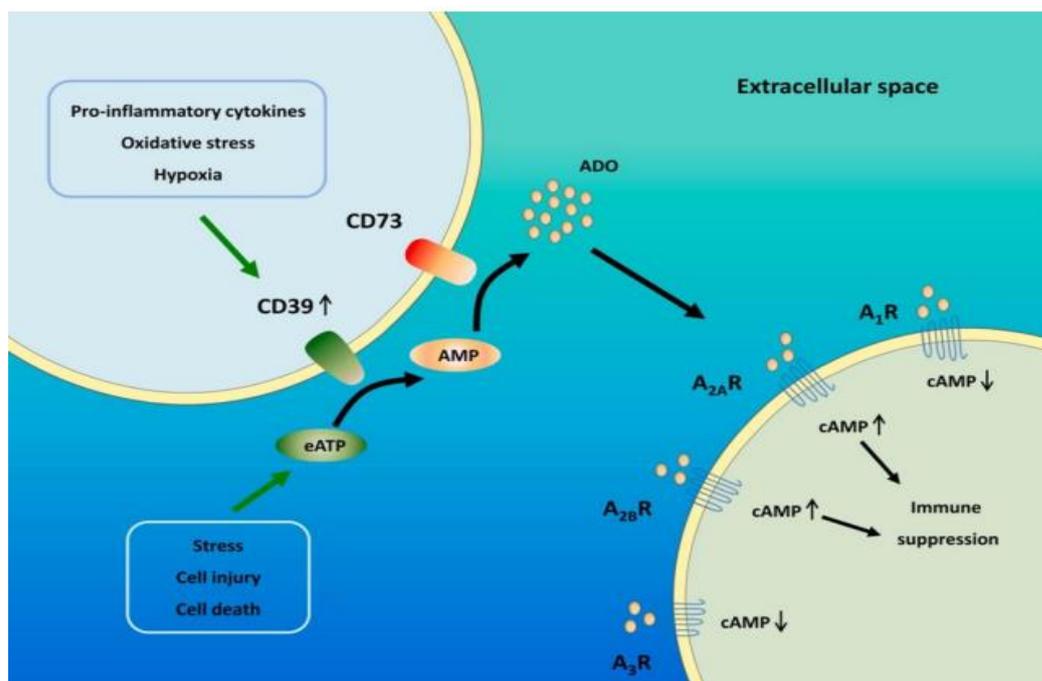


Figure 12 : Illustration de la fonction de CD39 et de la signalisation ATP/ADO (Jianru, Zhaochen, Yuzhong, & Huabao, 2020)

L'ATP peut être libéré par exocytose pendant le stress, les lésions cellulaires et la mort... CD39 hydrolyse l'ATP en AMP, qui est ensuite hydrolysé en ADO par CD73. L'ADO exerce ses effets régulateurs en se combinant avec ses récepteurs, notamment A1R, A2AR, A2BR et A3R. A1R et A3R suppriment la production d'AMPc, tandis que A2AR et A2BR déclenchent la production d'AMPc. L'activation de A2AR et A2BR dans les cellules immunitaires peut induire de puissants effets immunosuppresseurs. (Jianru, Zhaochen, Yuzhong, & Huabao, 2020)

Le CD39 est un médiateur de point de contrôle immunitaire récemment reconnu qui interfère avec la réponse immunitaire antitumorale ou anti-inflammatoire. (Bertrand, Maria, Simon, & Jean, 2017)

Alors que le CD39 joue un rôle important dans diverses maladies et présente un grand potentiel en tant que cible thérapeutique. (Jianru, Zhaochen, Yuzhong, & Huabao, 2020)

2. La sclérose en plaque et le CD39

Une réduction du nombre de cellules Treg CD39+ a été observée chez les patients atteints de la forme rémittente de la SEP et chez les patients atteints de la forme stable de la SEP. (Dacia Dalla, et al., 2011)

Cependant, Peelen et al. ont constaté qu'il n'y avait pas de différence significative entre le pourcentage de Tregs CD39+ chez les patients atteints de la forme rémittente de la SEP et celui des témoins sains (Peelen, et al., 2011)

En outre, des rapports ont montré que l'expression de CD39 dans les PBMC et la proportion de Tregs CD39+ étaient augmentées chez les patients atteints de SEP L'expression de CD39 a également augmenté dans le liquide céphalo-rachidien des patients atteints de SEP-RR et une corrélation positive significative entre CD39 et la cytokine anti-inflammatoire IL-10 a été observée . (Jianru, Zhaochen, Yuzhong, & Huabao, 2020)

Ces résultats contradictoires peuvent être dus à la différence entre les échantillons de patients ou les marqueurs de détection utilisés pour analyser les Tregs. Les cellules Th17 jouent un rôle important dans la SEP, elles sont la force motrice clé de la démyélinisation et de l'inflammation auto-immune du système nerveux central .Il a été démontré que les Tregs CD39+ suppriment les cellules Th17 pathogènes, mais cette capacité est significativement

altérée chez les patients atteints de SEP. Chez les patients atteints de SEP en phase rémittente, une association positive a été trouvée entre les pourcentages de cellules Th17 et de Tregs CD39+, ce qui pourrait refléter un mécanisme de compensation du sous-ensemble Th17 élargi. (Jianru, Zhaochen, Yuzhong, & Huabao, 2020)

3. La PCR (Polymerase Chain Reaction)

3.1. Définition

La PCR, Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérisation en chaîne, est une technique d'amplification enzymatique en vitro une région spécifique d'un acide nucléique donné qui permet l'acquisition d'un grand nombre de copies identiques de fragments d'ADN pour le détecter et l'étudier. (Deluzarche, 2019)

3.2. Fonctionnement de la PCR

Chaque test PCR nécessite la présence d'une **matrice d'ADN**, **d'amorces**, de **nucléotides** et **d'ADN polymérase**. (Lilit & Nidhi, 2013)

- ❖ **L'ADN polymérase** : est l'enzyme clé qui relie les nucléotides individuels pour former le produit de la PCR .
- ❖ **Les nucléotides** : comprennent les quatre bases - adénine, thymine, cytosine et guanine (A, T, C, G) - que l'on trouve dans l'ADN. Ils constituent les éléments de base utilisés par l'ADN polymérase pour créer le produit de la PCR.
- ❖ **Les amorces** : sont de courts fragments d'ADN avec une séquence définie complémentaire à l'ADN cible qui doit être détecté et amplifié. Ils servent comme un point d'extension sur lequel l'ADN polymérase peut s'appuyer. (Lilit & Nidhi, 2013)

Les composants susmentionnés sont mélangés dans un tube à essai ou une plaque à 96 puits, puis placés dans une machine (thermocycleur) qui permet de cycles répétés d'amplification de l'ADN en trois étapes. (Lilit & Nidhi, 2013)

Thermocycleur comporte un bloc thermique avec des trous dans lesquels sont insérés les tubes à essai ou les plaques contenant le mélange de réaction PCR. La machine élève et abaisse la température du bloc par étapes discrètes, précises et préprogrammées. (Lilit & Nidhi, 2013)

3.3. Les étapes

Une PCR se décompose en trois étapes :

- ❖ **Dénaturation** : Les deux brins d'ADN sont séparés par chauffage (95°C).
- ❖ **Hybridation** : En abaissant la température (50-70°C), des amorces constituées de courts fragments d'ADN s'hybrident sur le brin d'ADN.

- ❖ **Élongation** : La polymérase Taq polymérase complète la synthèse de l'amorce au brin d'ADN grâce à la présence d'oligonucléotides dans le milieu réactionnel. (Deluzarche, 2019)

A chaque répétition de ces trois étapes, le nombre de molécules d'ADN copiées double. (Lilit & Nidhi, 2013)

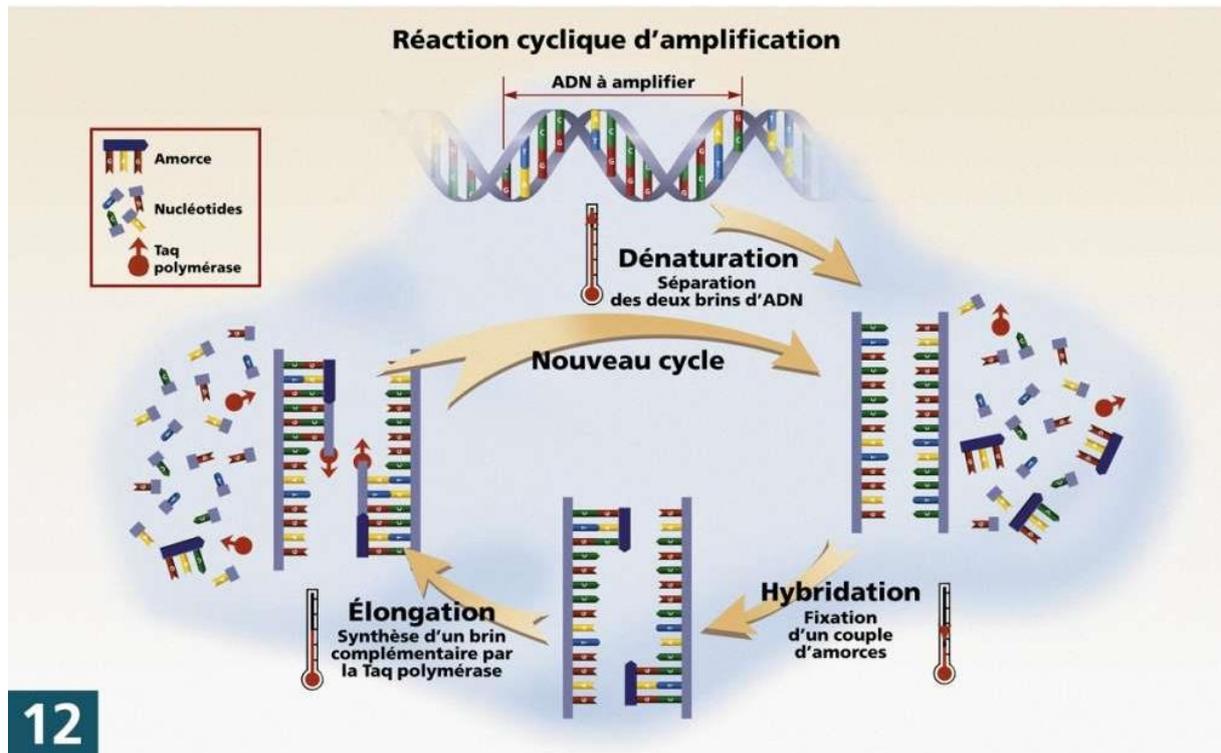


Figure 13 : Illustration de la technique d'amplification de l'ADN par PCR (Deluzarche, 2019)

3.4. Analyse du produit PCR

Il existe 2 méthodes principales pour visualiser les produits de la PCR :

- ❖ la coloration du produit d'ADN amplifié avec **un colorant chimique** comme le bromure d'éthidium, qui s'intercale entre les deux brins du duplex.
- ❖ le marquage des amorces PCR ou des nucléotides avec des **colorants fluorescents** (fluorophores) avant l'amplification PCR. (Lilit & Nidhi, 2013)

3.5. Les types de la PCR

PCR quantitative : est utilisée pour comparer les différences entre acides nucléiques cibles dans un échantillon biologique. Ceci est particulièrement pertinent quand la PCR quantitative est surtout appliquée à la mesure des variations temporelles et fonctionnelles des molécules d'ARN messagers chez les eucaryotes ou les procaryotes.

PCR en temps réel : permet de mesurer l'accumulation du produit de PCR à chaque cycle au cours de la réaction d'amplification. Le principe est d'utiliser un marquage fluorescent du produit de PCR. Le fluorochrome est ajouté à la réaction de PCR. La réaction de PCR et la détection du produit de PCR sont donc simultanées. L'appareil de PCR en temps réel n'est autre qu'un thermocycler classique sur lequel vient s'ajouter un détecteur de fluorescence. (CHINA, GHAFIR, & DAUBE, 2002)

3.6. Conception des amorces pour la PCR

La conception des amorces est un processus essentiel pour une réaction PCR efficace.

Pour définir et synthétiser des amorces, il est souvent nécessaire de connaître la séquence du fragment à amplifier. A partir des séquences disponibles, il est nécessaire de déterminer la séquence nucléotidique au niveau de laquelle la polymérase peut synthétiser des brins d'ADN de novo. Par conséquent, les amorces doivent être :

- Complémentaires des brins d'ADN existants.
- Orientées dans le bon sens de façon à permettre la synthèse d'ADN de 5' en 3'.
- Les amorces utilisées pour la PCR ont des longueurs habituellement comprises entre 17 et 25 pd.
- Les amorces sont obtenues par synthèse chimique, c'est-à-dire selon la séquence que définit l'expérimentateur.
- La température de fusion des amorces doivent être semblables, pour assurer une hybridation parfaite et pour éviter un mal amorcement. Généralement elle se situe entre 56 et 62 °C. (La PCR : rappels et mise à niveau - Choix des amorces)

Une sélection incorrecte des amorces peut entraîner l'échec des réactions PCR, une synthèse de gène médiocre ou nulle. (Lilit & Nidhi, 2013)

Matériels et méthodes

1. Matériels et méthodes

1.1. Objectif

L'objectif de notre travail était d'utiliser des outils bioinformatiques pour concevoir des amorces spécifiques qui encadrent le gène *ENTPD1* responsable d'une réaction Pro-inflammatoire, chez les patients SEP.

1.2. But

Montrer que notre amorce spécifique peut servir à effectuer des analyses PCR pour explorer l'effet du gène *ENTPD1* et sa relation avec la SEP, ou bien pour détecter les variant associés à la réaction Pro-inflammatoire de la SEP.

1.3. La séquence du gène *ENTPD1*

A l'aide de bases de données « ENSEMBL », on a recherché la séquence du gène *ENTPD1*, sur le site www.ensembl.org (figures 14 et 15).

The screenshot shows the Ensembl genome browser interface. At the top, there is a navigation bar with the Ensembl logo and links for BLAST/BLAT, VEP, Outils, BioMart, Téléchargements, Aide et documentation, and Blog. A search bar is located on the right side of the header. Below the navigation bar, there are several tool categories: Outils (with a link to 'Tous les outils'), Bio Mart (describing exporting personalized data), BLAST/BLAT (describing searching genomes), and Prédicteur d'effet de variante (describing variant analysis). A central search box is labeled 'Chercher' and includes a dropdown menu for 'Toutes les espèces' and an 'Aller' button. Below the search box, there are sections for 'Tous les génomes' (with a species selection dropdown) and 'Génomes préférés' (listing Human GRCh38.p13 and Souris GRCh39). On the right side, there is a text block about Ensembl's role in comparative genomics and a list of recent updates for version 106 (April 2022), including AlphaFoldDB data and new assemblies for zebrafish and carp. A 'Plus d'informations' link is provided. At the bottom right, there is a section for 'Ensemble à libération rapide' (Rapid Release) with an 'Aller' button.

Figure 14 : La base de données ‘Ensembl’

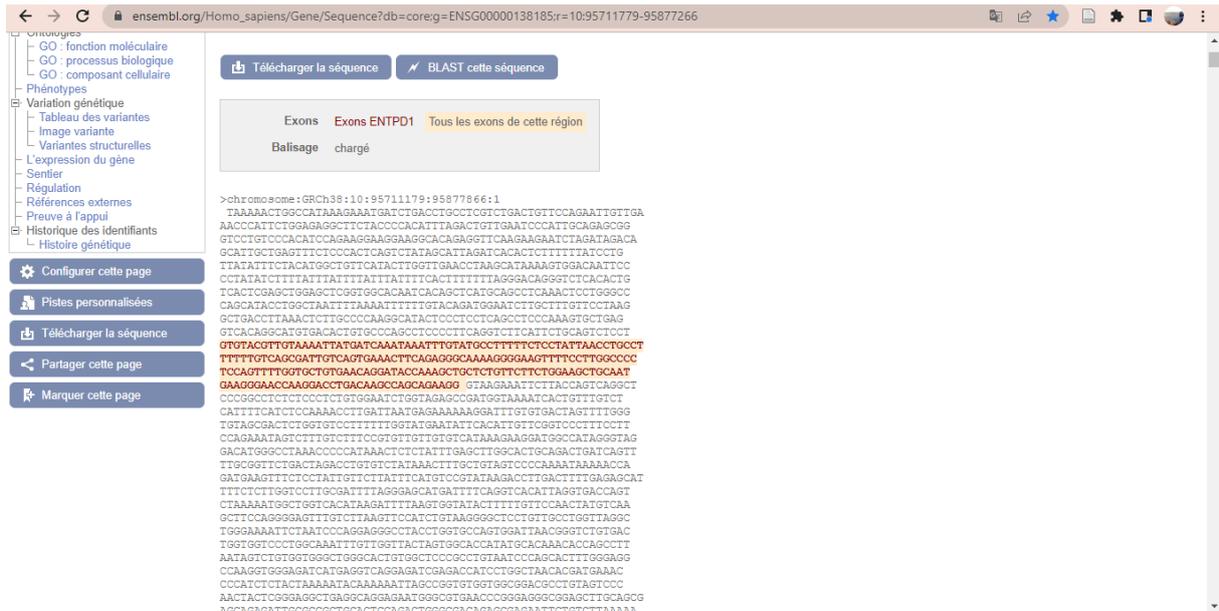


Figure15: La séquence de gène ENTPD1

1.4. L’amorce spécifique du gène ENTPD1

Pour obtenir une amorce spécifique du gène ENTPD1, on a utilisé la plateforme centre national américain de l’information biotechnologique (NCBI) et le logiciel Primer blaste sur le site <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (figure 16).

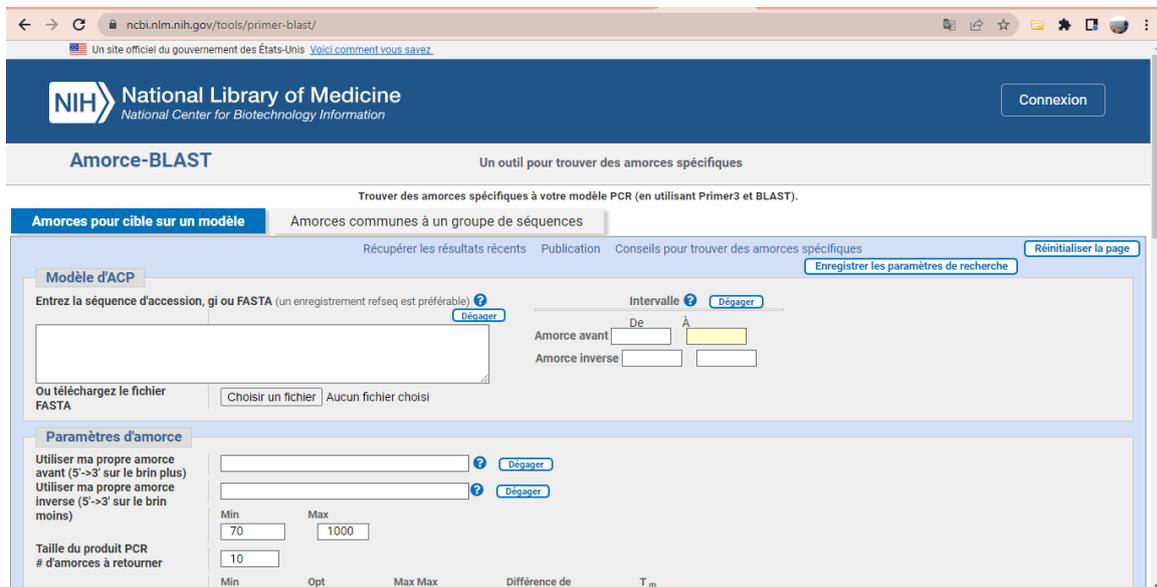


Figure 16 : L’outil Primer BLAST

- Pour Préciser l'étendu de la séquence où rechercher l'amorce sens ; on a sélectionné du début de la séquence encadrée au début de l'exon 3 et cliquez sur review, puis sur l'option statistiques, on obtient une fenêtre avec les chiffres à remplir.

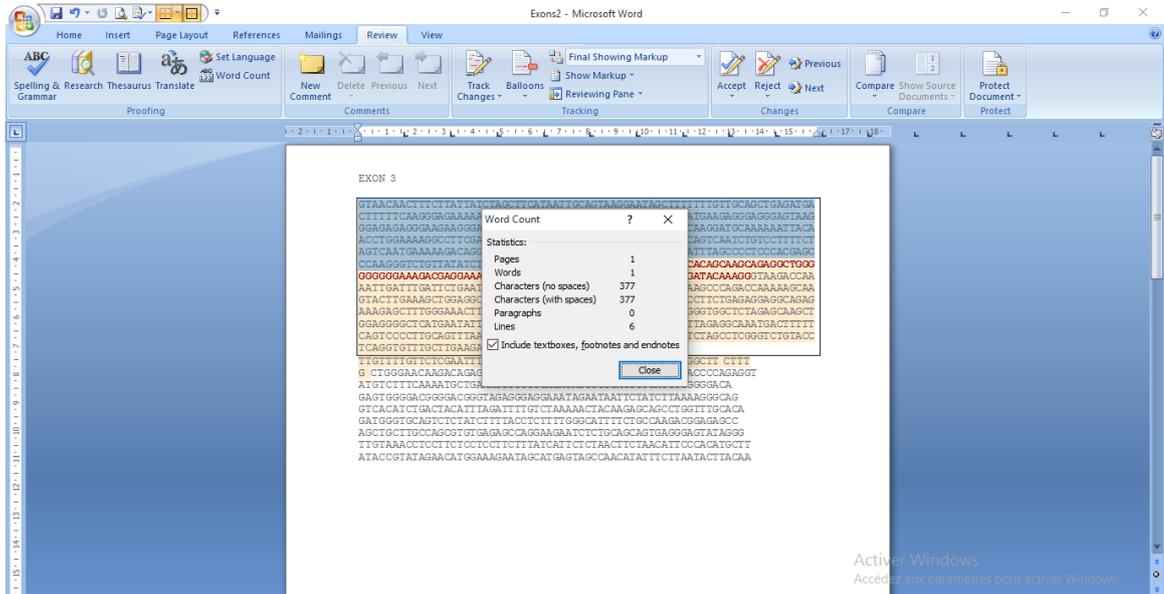


Figure 17: La numération des bases

- Ensuite, on a copié et collé la séquence de l'exon 3 que l'on veut amplifier dans primer BLAST.
- supprimer les espaces indésirables entre les nucléotides.

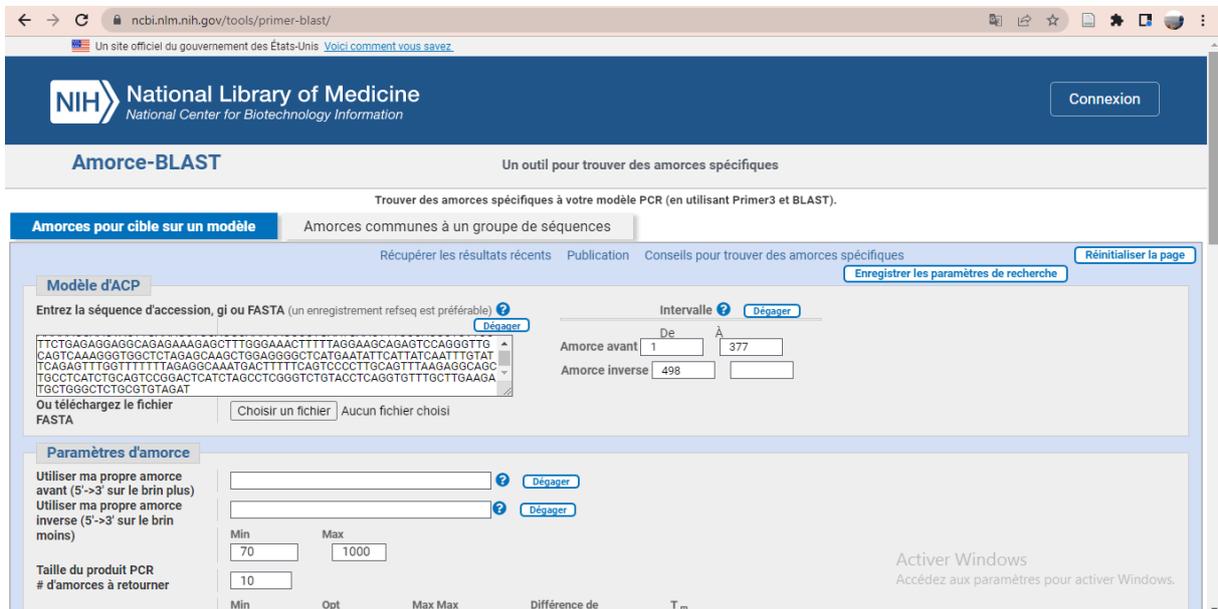


Figure 18 : L'ajoute de l'amorce sur primer-BLA

Résultats

1.5. Résultats de primer blast

Les résultats obtenus à partir de ce processus sont présentés ci-dessous, sur la figure 19 :

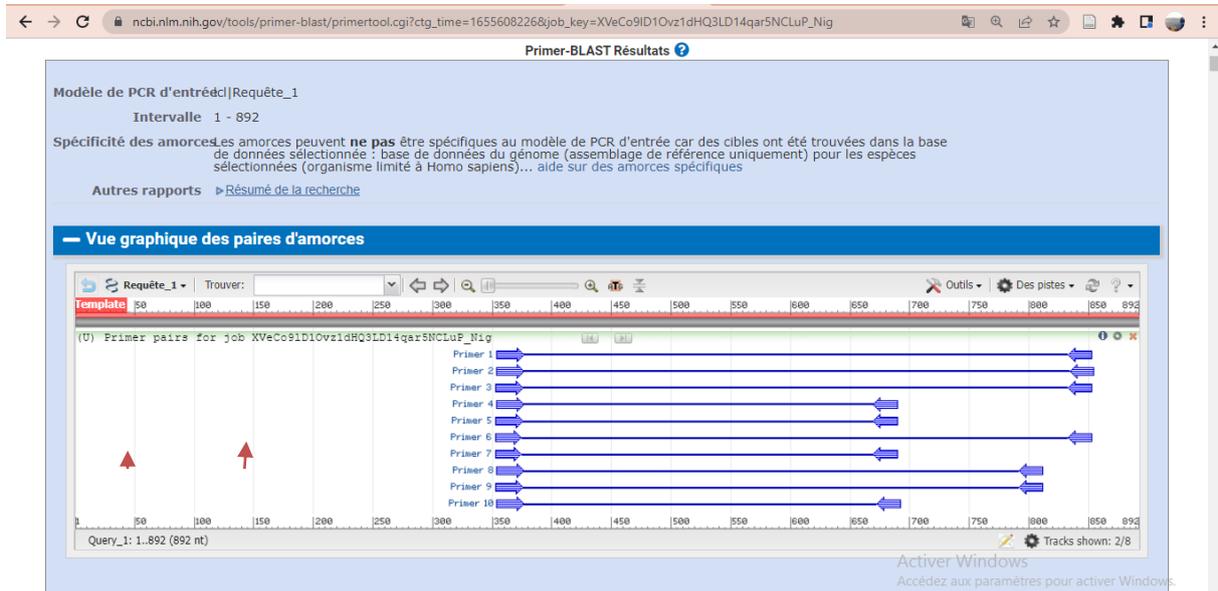


Figure 19: vue graphique des résultats (paires d'amorces)

1.5.1. Choix de la paire d'amorces :

Le choix de la paire d'amorce 3 parmi les 10 proposés s'est fait grâce aux caractéristiques qu'elle présente :

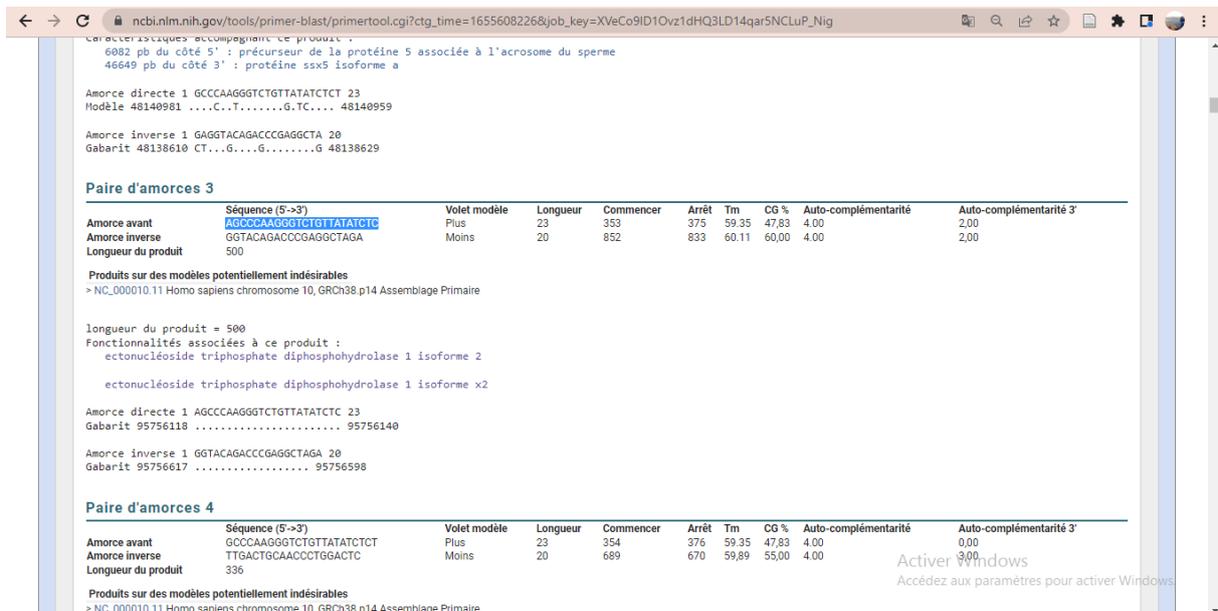


Figure 20 : Choix de la paire 3 parmi les résultats de primer BLAST

Résultats

1.6. Interprétation des résultats

- Ensembl décrit l'intégrité du gène ENTPD1 qui contient 13 exons et 14 introns.
- Primer blast permis de choisir l'exon 3 pour obtenir l'amorce spécifique du gène ENTPD1
- On a obtenu 10 paires d'amorces spécifique du gène ENTPD1 (exon 3) par l'utilisation du programme primer-blast.
- On a choisi la paire d'amorce 3 en raison de la présence des paramètres parfait :
 - ✓ La longueur du produit résultant de l'amorce spécifique est 500 pb inférieure à 800 pb (car la PCR n'amplifie pas une séquence comportant plus 800 pb).
 - ✓ longueur d'amorce direct = 23 pb, amorce inverse = 20 pb.
 - ✓ La température de fusion est très proche pour les l'amorce direct et l'amorce inverse (tableau 1).
 - ✓ La teneur en GC est 47% pour l'amorce directe et 60% pour l'amorce inverse.
 - ✓ Il n'y a aucun produit aspécifique.

1.7. Confirmation des résultats

La dernière étape de notre travail a été la confirmation des résultats, qui a été réalisée par "PCR in silico" via le site internet <https://genome.ucsc.edu/>, qui nous a fourni les résultats de notre produit spécifique sur la position du chromosome 10 a le locus exact, nous démontrons donc la spécificité de ces amorces.

The screenshot shows the UCSC Genome Browser interface for a PCR in silico analysis. The browser address bar shows the URL: genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?hgsid=1382111389_SDLYiqohkiSqDxiBlmTAA5AKFh8s&org=Human&db=hg38&wp_target=hg38KgSeqV39&wp_f=AGC...

The main content area is titled "PCR in silico UCSC" and contains the following information:

Les séquences et les coordonnées indiquées ci-dessous proviennent de GENCODE Genes, et non de l'assemblage du génome. Les liens mènent au navigateur de génome à la position de la séquence cible entière.

Attention : cette amplification est sur le complément inverse de ENST00000416301.5_ENTPD1-AS1 .

> ENST00000416301.5_ENTPD1-AS1:830-1329 500bp AGCCCAAGGCTGTATATCTC GTTCTTCTGAGGACTCTCTCAGGA
AGCCCAAGGCTGTATATCTC GTTCTTCTGAGGACTCTCTCAGGA
gacggaccacagcagcagaggctgggggggggaaagcagggaagagg
aggaaacaaagctgctacttggaaagatacaaaaggtaagaccacaaa
ttgattgatctgaatccttaagaaaaaaatagaagaaaaataaaa
gctcagactcaaaagcaagctctgaaagcgggaaggcaaaagccttgaa
tgaactttccaccctctctctgagagggcagaaagagccttttg
ggaacttttagaagcagagtcagggttcagtcagaaagggtgctccta
ggcaagctgggaaggctcatgaatattcattcaattgtattcagag
ttggttttttagaagcaaatgacttttcagtcctccttcagtttaaga
ggcagctgcctcattcagctcggactcaTCTAGCCTCGG6TCTGTACC

Températures de fusion de l'apprêt

Avant : 59,9 C agcccaaggctgttatatctc Inverse
: 59,3 C ggtagacccgggctaga
Les calculs de température sont effectués en supposant une concentration de sel de 50 mM et une concentration d'oligo de recuit de 50 nM. Le code pour calculer la température de fusion provient de [Primer3](#).

Aider

[Qu'est-ce que chr_alt & chr_fix ?](#)
[Réplication des résultats de la PCR in-silico sur une machine locale](#)

Activé Windows
Accédez aux paramètres pour activer Windows.

Figure 22 : Confirmation des résultats par PCR In Silico

Conclusion

Conclusion

Ce travail est un prélude à une étude cas témoins, concernant les variant du gène ENTPD1, En effet ces amorces serviront pour amplifier puis séquencer exon par exon, dans l'ADN des patients SEP Algériens et l'ADN des sujets témoins, pour faire une étude d'association des dits variant avec l'apparition de la SEP chez les patients algériens.

On a conçu des amorces pour l'analyse du gène ENTPD1, un gène dont le produit (CD39) est impliqué dans une réaction pro-inflammatoire.

Grâce aux outils de la bio-informatique, on a pu choisir les amorces servant à l'amplification de l'exon 3 du gène ENTPD. La paire d'amorce 3 spécifique a été obtenu. Cette paire d'amorces est conforme aux normes internationales (Température de fusion : 59°C, longueur : 20 nucléotides, produits spécifiques : 500 pb et aucun produits aspécifiques.

Ce travail a permis de nous initier aux outils Bioinformatiques et nous familiariser avec l'analyse des séquences génomiques, ainsi qu'une compréhension de l'importance du choix des amorces avant toute étude de génotypage dans une population donné

Références bibliographiques

Références bibliographiques

(Brochet, P. L. (2010). *neuropsychologie de la sclérose en plaques* . Elsevier Masson.

APIDPM, t. (2021, 05 19). *Santé Maghreb - Revue de presse*. Consulté le 05 25, 2022, sur <http://www.santemaghreb.com/actus.asp?id=29929>

Atara, N.-S., Gal, S., Ayelet, G., Or, K., Jacob, S., J. Moshe, G., et al. (2017). Defective ATP breakdown activity related to an ENTPD1 gene mutation demonstrated using 31P NMR spectroscopy. *The Royal Society of Chemistry* , 1.

Bertrand, A., Maria, S. L., Simon, R., & Jean, S. (2017). Les ectonucléotidases CD39 et CD73 : nouvelles cibles inhibitrices de points de contrôle. *Immunological Reviews* , 121–144.

Brassat, D. (2010, 03). Physiopathologie de la sclérose en plaques. *La Presse Médicale* , pp. 341-348.

Brigitte, C. (2012). SEP, la sclérose en plaques : une affection dysimmunitaire. *service neurologie CHU de Charleroi - site de Vésale* , 12.

Brochet, P. L. (2010). *neuropsychologie de la sclérose en plaques*. Elsevier Masson.

business france. (s.d.). Consulté le Décembre 2018, 3, sur Presse locale francophone: <https://www.businessfrance.fr/algerie-augmentation-du-nombre-de-cas-de-sclerose-en-plaques>

C.R. Maliszewski, G. D. (1994). L'antigène d'activation des cellules lymphoïdes CD39. Clonage moléculaire et caractérisation structurale. *J. Immunol* .

CHINA, B., GHAFIR, Y., & DAUBE, G. (2002). Estimation quantitative et qualitative par amplification génétique des bactéries présentes dans les denrées alimentaires. *Département des Sciences des Denrées Alimentaires, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonste* , 104-105.

Dacia Dalla, L., Diletta, D. M., Alessandra, B., Diego, C., Claudio, G., Maria, G. G., et al. (2011). T Regulatory Cells Are Markers of Disease Activity in Multiple Sclerosis Patients. *Plos One* .

David, B. (2010). Physiopathologie de la sclérose en plaques. *La Presse Médicale* , 341.

Deluzarche, C. (2019). *PCR - Amplification par PCR - Polymerase Chain Reaction*. Consulté le 05 29, 2022, sur Futura: <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/genetique-pcr-91/>

dysfonction erectile. (2015). Consulté le 05 31, 2022, sur Manifestations cliniques de la sclérose en plaques: <https://www.dysfonction-erectile.com/sclerose-en-plaques/definitions-et-generalites/manifestations-cliniques/>

fanny, A. (2009). La sclérose en plaques et son traitement. *Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de LIMOGUES de Paris* , 15-16.

Références bibliographiques

- Fanny, A. (2009). La sclérose en plaques et son traitement. *Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de LIMOGUES de Paris* , 15-16.
- Fletcher, M., Lalor, J., Sweeney, M., & Tubridy, N. (2010). T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol* , 1-11.
- Fondation Charcot stichting*. (2015, 05 04). Consulté le 06 16, 2022, sur Le rôle de l'immunomodulation: <https://www.fondation-charcot.org/fr/bulletins/37/le-r-le-de-limmunomodulation>
- Gallien, P., Benoit, N., & Albane, G. (2012). Le point sur la sclérose en plaques. *Elsevier Masson SAS* , 17.
- Granieri, E., Casetta, I., Govoni, V., MR, T., & Marchi, D. (2000). The increasing incidence and prevalence of MS in a Sardinian province. *Neurology* .
- Inserm. (2017, 06 23). Consulté le 05 30, 2022, sur Sclérose en plaques (SEP)Une recherche active pour améliorer la prise en charge des patients: <https://www.inserm.fr/dossier/sclerose-en-plaques-sep/>
- Inserm. (2017, 07 05). Consulté le 05 30, 2022, sur Maladies auto-immunes · Inserm, La science pour la santé: <https://www.inserm.fr/dossier/maladies-auto-immunes/>
- Jianru, z., Zhaochen, N., Yuzhong, W., & Huabao, X. (2020). Implications of CD39 in immune-related diseases. *elsevier* .
- Karni, A. A. (2006). Innate immunity in multiple sclerosis: myeloid dendritic cells in secondary progressive multiple sclerosis are activated and drive a proinflammatory immune response. *J Immunol* , 177, 4196-4202.
- Katia, J., & Gilbert, G. (2007). PCR en microbiologie : de l'amplification de l'ADN à l'interprétation du résultat. *Revue Medicale Suisse* , 106.
- Koppe, M. (2022). Quand l'IA s'attaque à la sclérose en plaques. *le journal CNRS* .
- La myéline*. (2019). Consulté le 06 26, 2022, sur Ela association européenne: <https://ela-asso.com/les-leucodystrophies/les-leucodystrophies-cest-quoi/la-myeline/>
- La PCR : rappels et mise à niveau - Choix des amorces*. (s.d.). Récupéré sur <https://www.supagro.fr/ress-tice/PCR/1/co/amorces.html>
- Labalette, m., bahram, s., & béné, M. C. (s.d.). Le complexe majeur d'histocompatibilité humain (HLA). 13.
- Le National Center for Biotechnology Information* . (s.d.). Consulté le 06 10, 2022, sur <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
- Le typage HLA à l'ère du séquençage à haut-débit*. (2014, 11 24). Consulté le 05 20, 2022, sur Biorigami: <https://www.biorigami.com/?p=6737>

Références bibliographiques

- Lee, S. (2020, 01). *Anatomie et physiologie du système nerveux*. Consulté le 05 12, 2020, sur Société canadienne du cancer: <https://cancer.ca/fr/cancer-information/cancer-types/neuroblastoma/what-is-neuroblastoma/the-nervous-system>
- Leila, N., & Smail, D. (2018). HLA et SEP : corrélation clinique et paraclinique. *REVUE NEUROLOGIQUE* .
- Li, S., Chen, X., Wang, M., Li, J., Feng, Y., & Sun, J. (2019). Identification and characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (CD39) involved in regulating extracellular ATP-mediated innate immune responses in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Molecular Immunology* , 11.
- Lilit, G., & Nidhi, A. (2013). Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology* , 1-2-3.
- Michael C. Levin, M. (2021). Autres maladies démyélinisantes primaires. *College of Medicine, University of Saskatchewan* .
- Michiels, Y. (2018). Connaissances actuelles sur la sclérose en plaques. *Actualités pharmaceutique* , 24-25.
- Mieux vivre avec la SEP*. (2017). Consulté le 06 26, 2022, sur Les manifestations de la SEP - Mieux vivre avec la sclérose en plaques: <https://www.mieux-vivre-avec-la-sep.com/comprendre/symptomes/manifestations-de-sep/>
- Milo, R., & Kahana, E. (2010). Multiple sclerosis: Geoeidemiology, genetics and the environment. *Autoimmunity Reviews* , A387-A394.
- Munkonda, M. K. (2007). Inhibition des NTPDases humaines et murines liées à la membrane plasmique par les antagonistes des récepteurs P2. *Biochimie. Pharm* , 1524-1534.
- Navigateur du génome d'ensemble 106*. (s.d.). Récupéré sur <https://www.ensembl.org/index.html>
- Papeix, C. (2011). La sclérose en plaque:s'informe pour mieux se soigne. *édition Odile Jacob* , 26-28.
- Passeport sante*. (2012, 12 20). Consulté le 06 26, 2022, sur Sclérose en plaques - Facteurs de risque: <https://www.passeportsante.net/fr/Maux/Problemes/Fiche.aspx?doc=sclerose-plaques-pm-facteurs-de-risque>
- Peelen, E., Jan, D., Joost, S., Stephanie, K., Paul, M., Jan Willem, C. T., et al. (2011). 7 expansion in MS patients is counterbalanced by an expanded CD39+ regulatory. *Journal of Neuroimmunology* , 97-103.
- polet, k., hesse, s., Kullmann, B., Morisot, A., Bresch, S., Cohen, M., et al. (2019, 04 01). Troubles oculomoteurs (TOM) aux différents stades de la sclérose en plaques : liens avec l'IRM. *crossref* , p. 85.
- Salou M., E. N. (2013). Immunité adaptative et physiopathologie de la sclérose en plaques. *Rev Médecine Interne* , 479-86.

Références bibliographiques

Sante-medecine.net. (2022, 02 22). *journal des femmes*. Consulté le 05 25, 2022, sur <https://sante.journaldesfemmes.fr/fiches-anatomie-et-examens/2789409-neurone-definition-schema/>

Schuler, G. (1997). Sequence mapping by electronic PCR. *Genome research* , 541–550.

Timperi, E., & Barnaba, V. (2021). CD39 Regulation and Functions in T Cells. *International Journal of Molecular Sciences* , 8068.

Venken K., H. N. (2008). Compromised CD4+ CD25(high) regulatory T-cell function in patients with relapsing remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the singlecell level. *Immunology* , 79-89.

تلخيص

تحدث أمراض المناعة الذاتية بسبب تدمير جهاز المناعة الذي يهاجم مكونات معينة من الجسم. في التصلب المتعدد ، هناك استجابة مناعية غير مناسبة ترى المايلين كجسم غريب ويسبب الالتهاب.

نتاج جين *ENTPDI* (CD39) المسؤول عن الاستجابة المؤيدة للالتهابات في مرضى التصلب المتعدد ، CD39 هو إنزيم وظيفته تحطيم ATP خارج الخلية.

هذا العمل هو مقدمة لدراسة الحالات والشواهد ، والمتعلقة بمتغيرات جين *ENTPDI*. في الواقع ، سيتم استخدام هذه البادئات لتضخيم ثم تسلسل exon بواسطة exon ، في الحمض النووي لمرضى MS الجزائريين والحمض النووي للأشخاص الضابطين ، من أجل إجراء دراسة حول ارتباط المتغيرات المذكورة مع ظهور MS. في المرضى الجزائريين.

Résumé

Les maladies auto-immunes sont causées par la destruction du système immunitaire qui attaque certains composants du corps. Dans la sclérose en plaques, il existe une réponse immunitaire inappropriée qui considère la myéline comme un corps étranger et provoque une inflammation.

Le produit du gène *ENTPDI*(CD39) responsable à une réaction pro-inflammatoire chez les patients du SEP, CD39 est une enzyme dont la fonction est de dégrader l'ATP extracellulaire.

Ce travail est un prélude à une étude cas témoins, concernant les variant du gène *ENTPDI*, En effet ces amorces serviront pour amplifier puis séquencer exon par exon, dans l'ADN des patients SEP Algériens et l'ADN des sujets témoins, pour faire une étude d'association des dits variant avec l'apparition de la SEP chez les patients algériens.

Abstract

Autoimmune diseases are caused by the destruction of the immune system which attacks certain components of the body. In multiple sclerosis, there is an inappropriate immune response that views myelin as a foreign body and causes inflammation.

The *ENTPDI* (CD39) gene product responsible for a pro-inflammatory response in MS patients, CD39 is an enzyme whose function is to degrade extracellular ATP.

This work is a prelude to a case-control study, concerning the variants of the *ENTPDI* gene.

Indeed, these primers will be used to amplify and then sequence exon by exon, in the DNA of the Algerian MS patients and the DNA of the control subjects, in order to make a study of the association of the said variants with the appearance of MS in the Algerian patients.