

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université ABOU BEKR 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 Chimie Analytique et d'Électrochimie



Mémoire présenté par
SABER Fatima Zohra Sabah
&
BERRAHIL Chaima

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

Option
« Biologie Moléculaire et Cellulaire »
Thème

Élaboration d'amorces pour l'amplification de l'exon 2 du gène de la sélénoprotéine : glutathion peroxydase 1

Soutenu le, 05/06/2024, devant le jury composé de :

Présidente : Mme BENMANSOUR Meriem	MCA	Université de Tlemcen
Examinatrice : Mme BERRAHOUI Samira	MCB	Université de Tlemcen
Encadrant : Mme MEDJATI-DENNOUNI Nouria	Professeur	Université de Tlemcen

Année universitaire 2023/2024



اهداء

قال الله تعالى: « قل اعملوا فسيرى الله عملكم ورسوله والمؤمنون »
الهي لا يطيب الليل إلا بشكرك ولا يطيب النهار إلا بطاعتك...ولا تطيب اللحظات إلا بذكرك...ولا تطيب الآخرة إلا بعفوك...ولا تطيب الجنة إلا برويتك

ﷺ

إلى من بلغ الرسالة وأدى الأمانة..ونصح الأمة..إلى نبي الرحمة ونور العالمين

سيدنا محمد صلى الله عليه وسلم

إلى من كلله الله بالهيبة والوقار.. إلى من علمني العطاء بدون انتظار.. إلى من أحمل اسمه بكل افتخار..أرجو من الله يرحمك و يجعلك من أهل الجنة
والفردوس الأعلى وستبقى كلماتك نجوما اهتدي بها اليوم وفي الغد وإلى الأبد

والذي العزيز...رحمه الله

وإلى القلب الكبير النابض بالحب والحنان إلى رمز العطف والحنان إلى من سيظل قلبي يدق لها حبا..

هي الغالية ... محفظها الله وظال عمرها

وإلى أخي الكبير الذي كان يضيء حياتي والسند القوي والنبع الذي كنت ارتوي منه حبا وحنانا.....

سأل بني أذن يجعلك يا أخي من دهر عباده الكرمين.....

وإلى من بهم يشد ساعدي وتعلو هامتي بهم سندي وركائز نجاحي إخواني

وإلى أصدقائي وجميع من وقفوا بجواري و ساعدوني بكل ما يملكون..

Fatima



Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à
Ma mère, qui a œuvré pour ma
réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses
précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à
travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon
éternelle gratitude ; je t'aime maman.*

***Mon père**, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de
sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire
en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles,
l'éducation et le soutien permanent venu de toi.*

*Mes chers frères **Oussama et Imad***

*Ma seule sœur **Imane** et ses filles **Ritad jet Selsabil***

*Mes adorables amies, mes sœurs **Youssra et Djawida**, je vous souhaite tout le
bien, le bonheur, et beaucoup de succès dans ta vie personnelle et
professionnelle.*

*Mon binôme **Fatima** et sa famille*

*Tout la famille **Berrahilet Hammadi***

CHAIMAA

Remerciements

Nous remercions ALLAH le Tout-puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience de mener à terme ce présent travail. Nous exprimons tout d'abord nos sincères remerciements à madame

DENNOUNI-MEDJATI NOURIA, PROFESSEUR au

Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université de Tlemcen, pour la proposition de ce sujet et pour nous avoir soutenue tout au long de cette période de mémoire de master.

*Nos sincères remerciements s'adressent **Mme Benmansour Meriem**, Maitre de conférence A au département de biologie à la faculté des sciences de la Nature et de la Vie, des sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou-Bakr Belkaid Tlemcen , pour l'honneur qu'elle nous a fait en tant que présidente du jury de ce mémoire.*

*Nos remerciements les plus sincères à **Mme BERRAHOUI Samira**, Maitre de conférence B au département de biologie à la faculté des sciences de la Nature et de la Vie, des sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou-Bakr Belkaid Tlemcen, qui a accepté d'examiner ce travail. Qu'elle trouve ici l'expression de toute notre reconnaissance*

*Nous adressons nos vifs remerciements à **Melle CHEBIEB IKRAM**, doctorante au département de biologie. Nous la remercions pour sa disponibilité, pour tout ce que nous avons pu apprendre dans les discussions que nous avons eues et pour les conseils qu'elle nous a prodigués.*

Résumé

La glutathion peroxydase est la protéine antioxydante la plus importante de la famille des sélénoprotéines. Elle permet de réduire et de détoxifier différents types de peroxydes en leur alcool correspondant, et ce aux dépens du glutathion. Elle constitue ainsi l'armure essentielle de l'organisme contre le stress oxydatif. La famille des glutathion peroxydases compte plusieurs membres, dont la glutathion peroxydase 1 (GPX1) qui est intracellulaire. Le gène GPX1 est localisé au niveau de la région 3p21.31 du chromosome 3.

L'objectif de ce travail est de concevoir avec spécifié un couple d'amorce encadrant un SNP C/T, au niveau du rs1050450 de l'exon 2 de l'enzyme glutathion peroxydase 1, de façon à amplifier cet exon.

L'utilisation du Primer-BLAST nous a permis de concevoir plusieurs couples d'amorces d'une longueur d'environ 20 nucléotides. La spécificité de ces amorces a été vérifiée grâce à l'outil UCSC. Le couple d'amorce le plus spécifique, encadrant la région d'intérêt, a été retenu.

En biologie moléculaire, la bioinformatique représente une étape cruciale avant toute manipulation. La conception d'amorces permettra d'étudier l'implication d'un polymorphisme génétique dans la survenue d'une pathologie associée au niveau de notre population.

Mots clés : GPX1, exon 2, rs1050450, amorces, amplification, SNP C/T.

Abstract

Glutathione peroxidase is the most important antioxidant protein in the selenoprotein family. It reduces and detoxifies various types of peroxides into their corresponding alcohols, at the expense of glutathione. It thus constitutes the body's essential armor against oxidative stress. The glutathione peroxidase family comprises several members, including the intracellular glutathione peroxidase 1 (GPX1). The GPX1 gene is ubiquitously located in the 3p21.31 region of chromosome 3.

The aim of this work is to design and specify a primer pair flanking a C/T SNP at rs1050450 of exon 2 of the glutathione peroxidase 1 enzyme, in order to amplify this exon.

Using Primer-BLAST, we were able to design several primer pairs of around 20 nucleotides in length. The specificity of these primers was checked using the UCSC tool. The most specific primer pair, flanking the region of interest, was selected.

In molecular biology, bioinformatics is a crucial step prior to any manipulation. The design of primers will make it possible to study the involvement of a genetic polymorphism in the occurrence of an associated pathology.

Key words: GPX1, exon 2, rs1050450, primers, amplification, SNP C/T.

المخلص

يُعد الجلوتاثيون بيروكسيديز أهم بروتين مضاد للأكسدة في عائلة البروتين السيلينوبروتيني. فهو يقلل ويزيل السموم من أنواع مختلفة من البيروكسيديات إلى الكحوليات المقابلة لها، على حساب الجلوتاثيون. وبالتالي فهو درع الجسم الأساسي ضد الإجهاد التأكسدي. تضم عائلة الجلوتاثيون بيروكسيديز العديد من الأعضاء، بما في ذلك الجلوتاثيون بيروكسيديز 1 داخل الخلايا (GPX1). يقع جين GPX1 في كل مكان في منطقة 3p21.31 من الكروموسوم 3.

والهدف من هذا العمل هو تصميم وتحديد زوج تمهيدي يحيط بـ C/T SNP في rs1050450 من الإكزون 2 من إنزيم الجلوتاثيون بيروكسيديز 1، من أجل تضخيم هذا الإكزون.

باستخدام برايمر-بلاست، تمكنا من تصميم عدة أزواج من البادئات التي يبلغ طولها حوالي 20 نيوكليوتيدات. تم التحقق من خصوصية هذه البادئات باستخدام أداة UCSC. وتم اختيار الزوج التمهيدي الأكثر تحديداً الذي يحيط بالمنطقة محل الاهتمام.

في البيولوجيا الجزيئية، تعد المعلوماتية الحيوية خطوة حاسمة قبل أي معالجة. سيجعل تصميم البادئات من الممكن دراسة تورط تعدد الأشكال الوراثية في حدوث علم الأمراض المرتبطة به.

الكلمات المفتاحية: rs1050450، GPX1، exon 2، البادئات، التضخيم، SNP C/T.

Table des matières

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

Introduction

Introduction	1
--------------------	---

Matériel et méthode

1. Recherche de la séquence du gène GPX-1.....	6
2. La conception des amorces.....	7
2.1. Les étapes du Primer-BLAST.....	7
3. Critères de sélection des amorces	9
3.1. La longueur des amorces	9
3.2. La température de fusion (T _m).....	9
3.3. La spécificité.....	9
3.4. Les séquences d'amorces complémentaires.....	9
3.5. Teneur en G/C et suites polypyrimidine (T, C) ou polypurine (A, G).....	10
3.6. La séquence à l'extrémité 3'.....	10
4. Vérification des amorces.....	10

Résultats

1. Recherche de la séquence de l'enzyme GPX 1 sur NCBI	12
2. Élaboration des amorces	14
3. Résultats d'amorces	15
3.1. Le choix de la meilleure paire d'amorce.....	15
4. La vérification de la spécificité de ces 3 paires d'amorces	17

Discussion et conclusion

Discussion.....	21
Conclusion	22
Références bibliographiques.....	23

Liste des tableaux

Tableau 01 : Caractéristiques des 3 paires d'amorces choisies.....	16
Tableau 02 : Les caractéristiques de la 2 ^{ème} paire d'amorce	19

Liste des figures

Figure 01 : Position du gène <i>GPX-1</i> sur le chromosome 3.....	2
Figure 02 : Image de la plateforme NCBI utilisée.....	6
Figure 03 : Les étapes pour générer les amorces via primer blast	8
Figure 04 : Plateforme de vérification UCSC In-silico PCR.....	10
Figure 05 : Recherche de la séquence du polymorphisme rs1050450 sur la base de données SNP Du NCB.....	12
Figure 06 : La séquence d'intérêt qui contient le polymorphisme rs1050450.....	13
Figure 07 : Les étapes pour trouver les amorces spécifiques par Primer-BLAST.....	14
Figure 08 : Résultats de la conception d'amorces par Primer-BLAST.....	15
Figure 09 : Sélection des bonnes paires d'amorce.....	16
Figure 10 : Spécificité des amorces.....	17
Figure 11 : Résultat de la 1 ^{ère} paire par UCSC In-Silico PCR.....	19
Figure 12 : Résultat de la 2 ^{ème} paire par UCSC In-Silico PCR.....	18
Figure 13 : Résultat de la 3 ^{ème} paire par UCSC In-Silico PCR.....	18

Liste des abréviations

GPX	Glutathion peroxydase
GPX1	Glutathion peroxydase1
GSH	Glutathion réduit
DIOs	Iodothyronines déiodinases
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HOO	Radical hydroperoxyde
PCR	Polymerase Chain Reaction
ROS	Reactive oxygen species
Se	Sélénium
SePP	Sélénoprotéine P
SECIS	Séquence d'insertion Sec
T_m	La température de fusion
TrxRs	Thioredoxines réductases

Introduction

Le sélénium (Se) est un micronutriment et un oligo-élément non métallique essentiel pour l'homme et les animaux (*Stoffaneller et al. 2015*). Il a été découvert par le chimiste Jons Jacob Berzelius, en 1817 (*Hatfield et al, 2006*). Son rôle est attribué à sa présence dans les sélénoprotéines, en faisant partie du 21^{ème}acide aminé, la sélénocystéine (*Jun lu et al, 2008*). Plus de trente sélénoprotéines spécifiques ont été identifiées dans leur forme pure. Les principales sont les familles des glutathion peroxydases (GPX), des thioredoxines réductases (TrxRs), des iodothyronine déiodinases (DIOs), de la sélénoprotéine P (SePP), et bien d'autres (*Sobolev et al, 2018*). Agissant sur plusieurs variétés de substrats, les sélénoprotéines ont de multiples fonctions biologiques ; telles que la signalisation intracellulaire, l'homéostasie redox et le métabolisme des hormones thyroïdiennes (*Papp et al, 2007*).

Les GPX appartiennent à une famille de multiples isoenzymes qui métabolisent une grande variété d'hydroperoxydes (R-OOH). Elles catalysent aussi la réduction de H₂O₂ en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme donneur d'électrons.

Il existe cinq isoformes différentes des GPX séléno-dépendantes, caractérisées par la présence d'un atome de sélénium au niveau de leur site actif (GPX1-4 et 6), et trois isoformes séléno-indépendantes (GPX 5, 7 et 8) qui comprennent de la cystéine au lieu de la sélénocystéine (*Sgaier, 2019*).

L'ensemble de ces enzymes forment un groupe homogène avec des blocs de conservation qui sont indispensables à leur activité dont un motif structural de trois acides aminés : le tryptophane, la glutamine et la sélénocystéine (*Chabory, 2009*).

Les glutathion peroxydases à sélénium sont retrouvées dans le plasma (pGPX), dans le cytosol (cGPX), au niveau de la membrane cellulaire (HPGPX) ou celle de la mitochondrie, et on retrouve une isoenzyme qui est spécifique aux cellules digestives (GIGPX) (*Tichati, 2020*).

La fonction antioxydante des GPX dépend de la nature de chaque isoforme et de leur localisation dans les cellules, par exemple la GPX 1 est localisée universellement dans le cytosol et les mitochondries, la GPX2 dans l'épithélium de l'intestin et la GPX 3 dans le plasma cellulaire (*Sgaier, 2019*).

La GPX1 a été découverte en 1957 par Mills comme étant une enzyme exprimée dans l'espace intracellulaire ainsi qu'au niveau des érythrocytes pour les protéger du stress oxydatif. Ce n'est que plus tard qu'on découvre qu'elle présente sur son site actif une sélénocystéine (*Tichati, 2020*).

Introduction

Le gène de la glutathion peroxydase (GPX1) humain est localisé au niveau de la région 3p21.31. Il contient 1183pb et comprend 2 exons et 3 introns. Deux autres locus pour ce gène ont été trouvés dans le chromosome 21 et le chromosome X considérés comme des pseudogènes. Dans les cellules humaines, huit gènes identifiés codent pour des isoformes distinctes des GPX séléno-dépendantes et non sélé-nodépendantes : GPX1 (locus 3p21.3), GPX2 (locus14q24.1), GPX3 (locus 5q23), GPX4 (locus 19p13.3), GPX5 (locus 6p22.1), GPX6 (locus 6p22.1), GPX7 (locus 1p32) et GPX8 (locus 5q11.2) (Meteoukki, 2022).

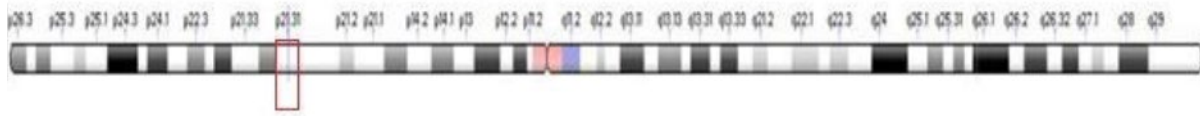


Figure 01 : Position du gène *GPX-1* sur le chromosome 3, d'après

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/gene/?id=2876>

La protéine GPX1 est un homotétramère constituée de quatre sous-unités identiques d'un poids moléculaire de 22 à 23 kDa. Chaque monomère contient environ 208 acides aminés (Yangjing et al, 2022).

Cette sélénoprotéine qui contient un acide aminé non canonique la sélénocystéine (Sec) sur son site actif, est codé par le codon UGA, qui signale normalement la fin de la traduction. Les 3' UTR des ARNm de sélénoprotéines contiennent une structure tige-boucle conservée, appelée élément de séquence d'insertion Sec (SECIS), qui est nécessaire à la reconnaissance de l'UGA en tant que codon Sec , plutôt que comme signal d'arrêt.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=2876#gene-expression>)

L'activité enzymatique GPX1 peut prévenir les dommages de l'acide nucléique (ADN) et inhiber la synthèse d'intermédiaires inflammatoires tels que la prostaglandine et les leucotriènes (Brigelius-Flohé et Maiorin, 2013). C'est pourquoi différentes maladies ont été associées à des mutations des gènes codant cette enzyme. Cette protéine est exprimée dans les cellules endothéliales et a été impliquée dans les maladies cardiovasculaires. Une association importante entre l'expression de GPX1 et les taux plasmatiques d'homocystéine a été documentée. Des niveaux élevés d'homocystéine peuvent augmenter les niveaux de ROS, entraînant des lésions endothéliales dans la pathogenèse de l'athérogénèse (Lei XinGen et al, 2007).

De même que des preuves considérables lient la GPX1 à la pathogenèse des maladies neurodégénératives, très probablement par son activité d'élimination des peroxydes. En effet, la GPX1 est connu pour se localiser principalement dans les cellules gliales, dans lesquelles l'activité de GPX1 est dix fois plus élevée que dans d'autres régions du cerveau . De plus, il y'a une surexpression de la GPX1 autour des régions cérébrales endommagées chez les patients atteints de la maladie de Parkinson (*Lei XinGen et al ,2007*).

A l'heure actuelle d'autres pathologies ont été associées à un dysfonctionnement de cette enzyme. D'ailleurs beaucoup de travaux ont montré que certains polymorphismes du gène codant cette protéine sont associés à une activité abaissée de l'enzyme, augmentant de ce fait le risque de développer des maladies aussi graves que variées. C'est pourquoi en biologie moléculaire, il convient de développer de nouvelles approches permettant une meilleure connaissance des mécanismes impliquées dans la genèse des différentes pathologies (*Vert ,2013*).

La bioinformatique est un outil qui prend de plus en plus de l'essor en biologie moléculaire. A l'heure où les technologies à haut débit en génomique et en protéomique envahissent les laboratoires de biologie, les sciences de la vie font face à un déluge de données extraordinairement volumineuses et complexes. Manipuler ces données et en extraire un sens biologique requiert de nouvelles approches basées sur la modélisation et l'informatique. La bioinformatique est tout à la fois une science, à l'interface entre l'informatique et la biologie, et une industrie vitale pour stocker, diffuser, analyser et interpréter les données biologiques en vue de leur exploitation dans l'industrie de la santé, l'agroalimentaire ou l'énergie (*Vert ,2013*). En biologie moléculaire, la bio-informatique représente une étape cruciale avant toute manipulation. L'élaboration des amorces par bioinformatique est une étape importante dans la préparation d'une réaction de PCR (Polymerase Chain Reaction) ou d'autres techniques d'amplification d'ADN. L'amplification d'une concentration infime d'ADN peut s'effectuer soit par des méthodes d'amplification in vivo utilisant des bactéries, le clonage, soit par des méthodes d'amplification in vitro par voie enzymatique, la Polymerase Chain Reaction (PCR) ou réaction de polymérisation en chaîne (*Payet, 2018*).

L'introduction, en 1985, de cette méthode permettant de multiplier des fragments d'ADN d'origines définies indépendamment de tout système cellulaire, inaugura une nouvelle ère de la génétique moléculaire. Cette technologie fondamentale s'est rapidement propagée avec le développement de l'équipement automatisé dans les laboratoires de recherche fondamentale et appliquée (*Eberhard ,2003*).

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

Pour ce faire, les séquences d'amplification nécessitent des amorces d'ADN. Les amorces sont de courtes séquences oligonucléotidiques d'ADN monocaténaire, utilisées lors des PCR pour amplifier une séquence d'ADN bien déterminée. Les deux amorces utilisées doivent avoir une longueur de 15 à 25 nucléotides, ce qui demande une température d'hybridation raisonnablement élevée. Les amorces sont complémentaires aux séquences des extrémités 3' et 5' de la séquence cible et s'hybrident spécifiquement sur elles (*Eberhard,2003*).

Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes :

1. La dénaturation thermique des ADN double brin en ADN simple brin .
2. L'hybridation de deux oligonucléotides (couples d'amorces) de part et d'autre de la séquence à amplifier (sur les brins cibles dénaturés).
3. L'extension ou élongation enzymatique des amorces par une ADN polymérase thermorésistante. Cette dernière phase permet la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire par une ADN polymérase ADN dépendante thermostable (la Taq polymérase étant la plus utilisée). Elle reste fonctionnelle tout au long de la PCR (*Payet, 2018*). Ce cycle est répété un grand nombre de fois pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible (la durée d'un cycle est de l'ordre de la minute).

Les outils bioinformatiques sont donc utilisés pour concevoir des amorces spécifiques, évitant ainsi les amplifications non spécifiques et les problèmes potentiels.

L'objectif de ce travail est de concevoir avec exactitude et spécificité un couple d'amorce encadrant le rs1040450 du gène GPX1 en regard du rôle vital de cette enzyme, afin de maîtriser cet aspect primordial de la bioinformatique.

La région d'intérêt est située au niveau de l'exon 2, qui comprend un SNP (C/T). Ce polymorphisme d'un seul nucléotide est la forme la plus fréquente de variation génétique chez l'homme. Présent avec des fréquences variables dans la population générale, il constitue une des sources majeures de variation interindividuelle génétique et phénotypique. Cette variabilité génétique est associée à différentes pathologies.

Matériel et méthodes

1. Recherche de la séquence du gène GPX1 :

La conception des amorces est une étape primordiale pour la réalisation des PCR. Avant de construire les amorces, il faut cibler la région d'intérêt devant être amplifiée. Il peut s'agir d'un gène, d'un exon, d'une région encadrant un polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP) et bien d'autres. Dans ce cas, nous avons ciblé l'exon 2 de l'enzyme glutathion peroxydase 1, qui comprend un SNP (C/T) au niveau rs1050450, nous avons élaboré des amorces de façon à amplifier cet exon. Il existe plusieurs outils de bio-informatique qui permettent de trouver la bonne séquence.

Trois bases de données peuvent être utilisées gratuitement. La base de données GenBank du centre national d'information technologique américain (National Center of Biotechnology Information – NCBI) qui contient plus de 76 million de séquences nucléiques. La base de données EMBL (European Molecular Biology Laboratory) de l'institut bioinformatique européen (EuropeanBioinformatics Institute – EBI). La troisième base est celle du centre pour l'information biologique du Japon (Center for Information Biology – CIB), la DDBJ (DNA Data Bank of Japan) (ZEKRI, 2015).

La séquence et la structure exon-intron du gène GPX1 est obtenue à partir de la base de données NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/sitemap/> (Bigot et al, 2009).

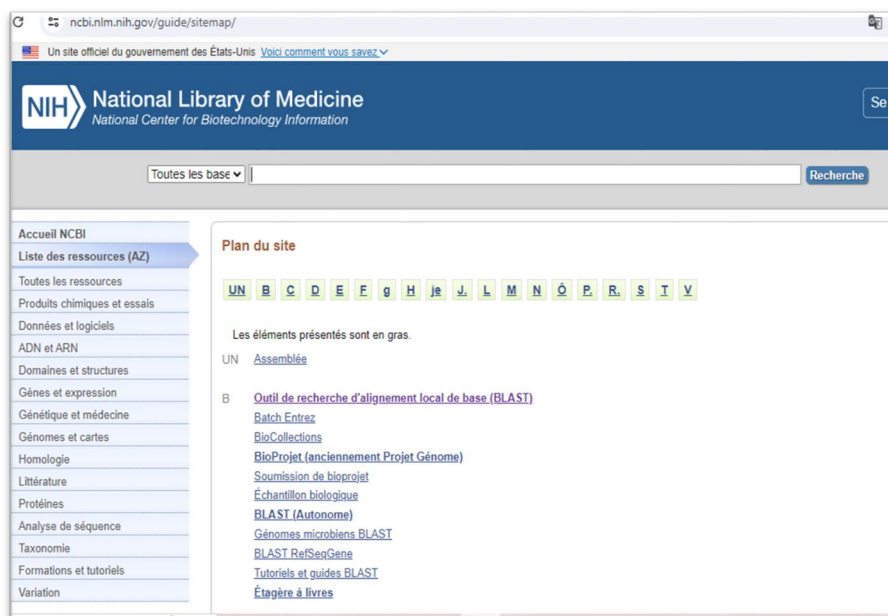


Figure 02: la plateforme NCBI utilisée

2. La conception des amorces :

Il existe plusieurs sites permettant la conception d'amorces telle que NetPrimer, Primer3, primer-BLAST, et bien d'autres.

Dans la base de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI), nous avons utilisé l'extension Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) afin de concevoir les amorces recherchées. Primer-BLAST est un outil permettant de concevoir des amorces spécifiques à une cible pour la réaction en chaîne par polymérase.

Cet outil combine BLAST avec un algorithme d'alignement global pour garantir un alignement complet entre l'amorce et la cible. Il est suffisamment sensible pour détecter les cibles qui présentent un nombre important de mésappariements avec les amorces. Primer-BLAST permet aux utilisateurs de concevoir de nouvelles amorces spécifiques à une cible en une seule étape et de vérifier la spécificité d'amorces préexistantes. Primer-BLAST permet également de placer les amorces en fonction de l'emplacement des exon/intron et d'exclure les sites de polymorphisme nucléotidique simple (SNP) dans les amorces.

2.1. Les étapes du primer-BLAST :

Étape 1 :

Copier la séquence déjà choisie dans NCBI.

Étape 2 :

Coller la séquence d'intérêt dans primer-BLAST.

Étape 3 :

Supprimer les intervalles non souhaités.

Étape 4 :

Cliquez pour commencer sur initier la recherche des amorces (cliquer sur obtenez des amorces) après avoir collé la séquence d'intérêt.

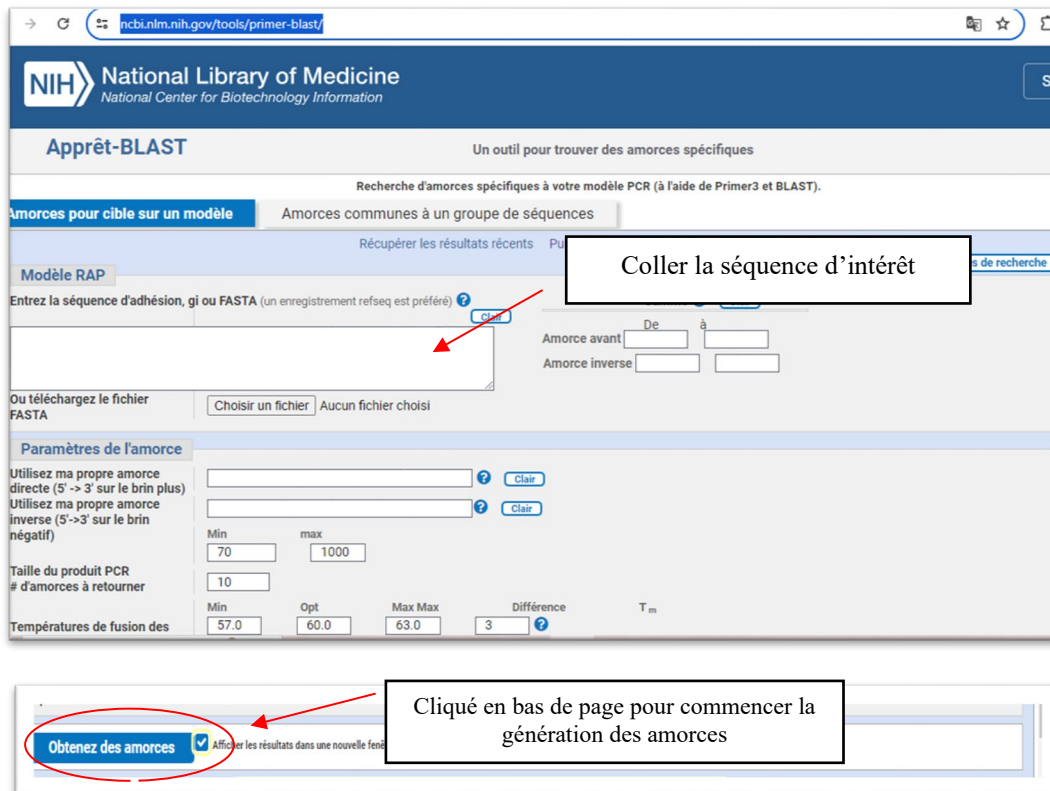


Figure 03 : Les étapes pour générer les amorces via primer-BLAST

3. Critères de sélection des amorces :

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

3.1. La longueur des amorces :

Les amorces utilisées pour la PCR doivent avoir une longueur habituellement comprise entre 17 et 25 bases et doivent être spécifiques à la séquence à amplifier.

La longueur de l'amorce est proportionnelle à l'efficacité de l'hybridation, l'objectif est de concevoir une amorce dont la température d'hybridation est d'au moins 50 °C, plus l'amorce est longue, moins l'hybridation est efficace. Le nombre de matrices amorcées diminuant à chaque étape, cela peut aboutir à une diminution sensible du produit amplifié (*Innis et Gelfan, 1994*).

3.2. La température de fusion (T_m) :

Une température de fusion de 50 - 60 °C donne les meilleurs résultats, elle correspond à une longueur d'amorce de 17-25 bases. Les deux amorces d'oligonucléotides doivent être conçues de sorte qu'elles aient des températures de fusion semblables.

3.3. La spécificité :

La spécificité de l'amorce dépend au moins partiellement de la longueur de l'amorce. Il est évident qu'il y a beaucoup plus d'oligonucléotides uniques à 24 paires de bases qu'à 15 paires de bases. Les amorces doivent être choisies de telle sorte qu'elles aient une séquence unique dans l'ADN matrice qui doit être amplifié. Une amorce conçue avec une séquence hautement répétitive conduira à une traînée lors de l'amplification d'ADN génomique.

3.4. Les séquences d'amorces complémentaires :

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

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

(Ayyadevara et al, 2000).

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

La teneur en G+C doit être d'environ 50 %. La richesse en GC améliore la stabilité du duplex amorce-matrice. La séquence d'amorce doit être choisie de telle sorte qu'il n'y ait aucune suite poly-G ou poly-C pouvant promouvoir une hybridation non spécifique.

Les suites poly pyrimidine (T, C) et poly purine (A, G) devraient également être évitées.

3.6. La séquence à l'extrémité 3' :

Le moteur de la PCR est une ADN-polymérase. Pour qu'elle puisse allonger une amorce appariée à un brin d'ADN, cette enzyme doit pouvoir « s'asseoir » sur l'extrémité 3' de l'amorce. De nombreuses études ont montré l'importance de ne pas avoir de mésappariements à l'extrémité 3' de l'amorce et que plus on s'éloigne de l'extrémité 3', moins les mésappariements compteront contre une possible élongation de l'amorce (*Ayyadevara et al*, 2000).

4. Vérification des amorces :

Enfin l'utilisation du UCSC In-Silico PCR (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>) permet de vérifier la fiabilité des amorces, et confirmer la spécificité des amorces que nous avons conçues.

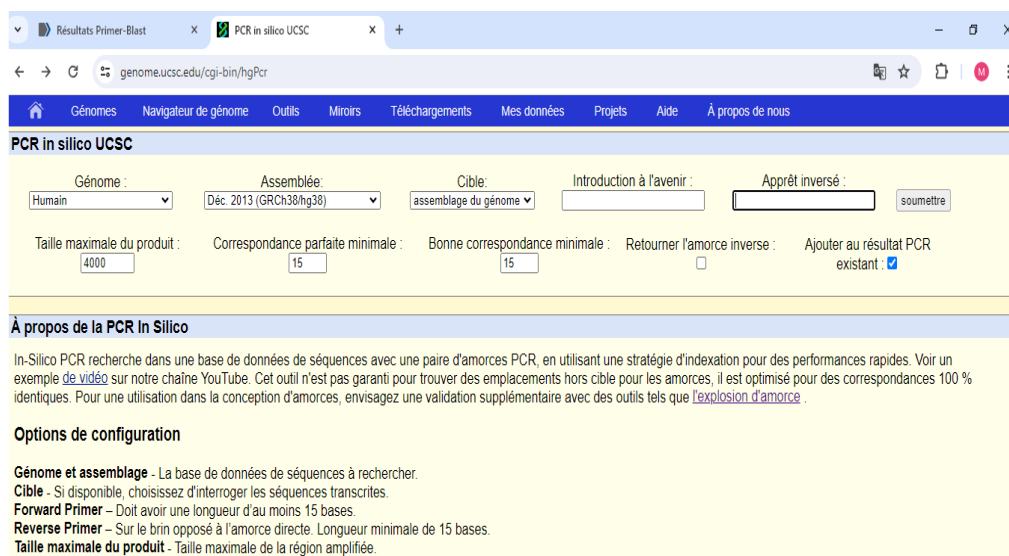


Figure 04 : Plateforme de vérification UCSC In-silico PCR

Résultats

1. Recherche de la séquence de l'enzyme GPX 1 sur NCBI :

La glutathion peroxydase (GPX) est un puissant antioxydant qui joue un rôle important dans la survie des cellules. La substitution de la cytosine par la thymine (C> T) est le polymorphisme le plus étudié pour la GPX1. Ce polymorphisme entraîne la substitution de la proline par la leucine dans le codon 198 de l'exon 2 (Pro198Leu, rs1050450) (Arrasyid et al, 2021).

La séquence de la région d'intérêt qui encadre le polymorphisme rs1050450 a été trouvée dans le NCBI, après avoir introduit les paramètres du SNP (Figure 5).



Figure 05: Recherche de la séquence du polymorphisme rs1050450 sur la base de données SNP Du NCB

Les résultats issus de notre recherche sont présentés dans la Figure 6. La figure résume les informations suivantes :

- rs1050450 (homo sapiens) : l'identité de notre SNP ainsi que l'organisme concerné,
- l'allèle G>A : cela signifie que la guanine est la base ancestrale (référence) qui a été changée par A (adénine). En cliquant sur show flask, on voit notre séquence nucléotidique et en rouge notre substitution (**Figure6**).

rs1050450 [*Homo sapiens*]
1.

Type de variante : SNV
Allèles : G>A [Masquer les flancs]

```
AGGTTTAGAGGAAACACCCTCATAGATGAAAACCCCCCGAGACAGCAGC
ACTGCAACTGCCAAGCAGCCGGGGTAGGAGGGGGCCCTAGGCACAGCTG
[G/A]
GCCCTTGAGACAGCAGGGCTTCGATGTCAGGCTCGATGTCAATGGTCTGG
AAGCGGCGGCTGTACCTGCGTAGGGGCACACCGTCAGGGCCCACCAGGAA
```

Figure 06 : La séquence d'intérêt qui contient le polymorphisme rs1050450

2. Élaboration des amorces :

Après avoir trouvé notre séquence, nous avons utilisé le site Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) afin de concevoir les amorces.

Pour cela, on avait copié la séquence trouvée (**Figure 6**) et collé dans son champ spécifique (**Figure 7**), et obtenu les amorces.

The image shows two screenshots of the Primer-BLAST web interface. The top screenshot displays the 'Modèle RAP' section where a DNA sequence is pasted into the 'Entrez la séquence d'adhésion, gi ou FASTA' field. A red arrow points to the 'OK' button next to the input field. Below the input field, there are sections for 'Gamme' (range) and 'Paramètres de l'amorce' (primer parameters). The bottom screenshot shows the 'Obtenez des amorces' button with two checked checkboxes: 'Afficher les résultats dans une nouvelle fenêtre' and 'Utiliser une nouvelle vue graphique'. A red arrow points to the 'Obtenez des amorces' button.

Figure 07 : Les étapes pour trouver les amorces spécifiques par Primer-BLAST

3. Résultats d'amorces :

Les résultats des amorces trouvées sont présentés dans la (Figure 08). Le site avait généré 10 paires d'amorce (Figure 08).

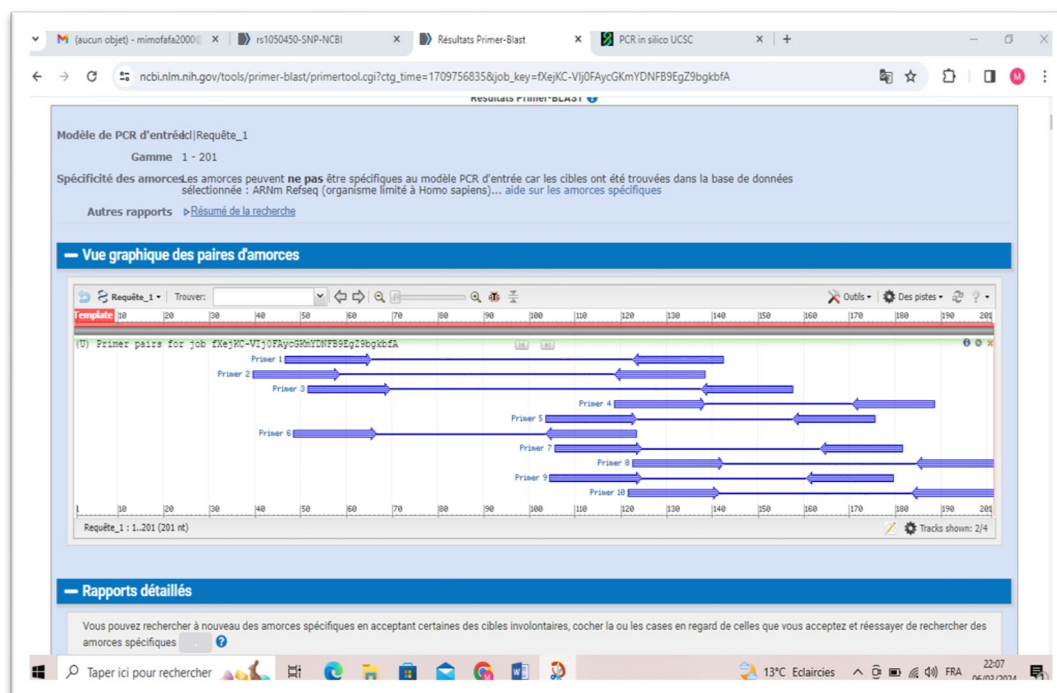


Figure 08 : Résultats de la conception d'amorces par Primer-BLAST

L'étape ultime consiste à choisir la meilleure paire d'amorce. Pour cela, il faut procéder à la vérification des amorces en appliquant les critères de sélection ainsi que le site UCS PCR in silico.

3.1. Le choix de la meilleure paire d'amorce :

Comme le but de cette recherche est d'amplifier la région qui contient le polymorphisme ciblé, nous avons éliminé les amorces non spécifiques parce qu'elles n'amplifient pas notre région d'intérêt. En appliquant ce critère, nous avons éliminé les amorces numéros 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10 (Figure 09).

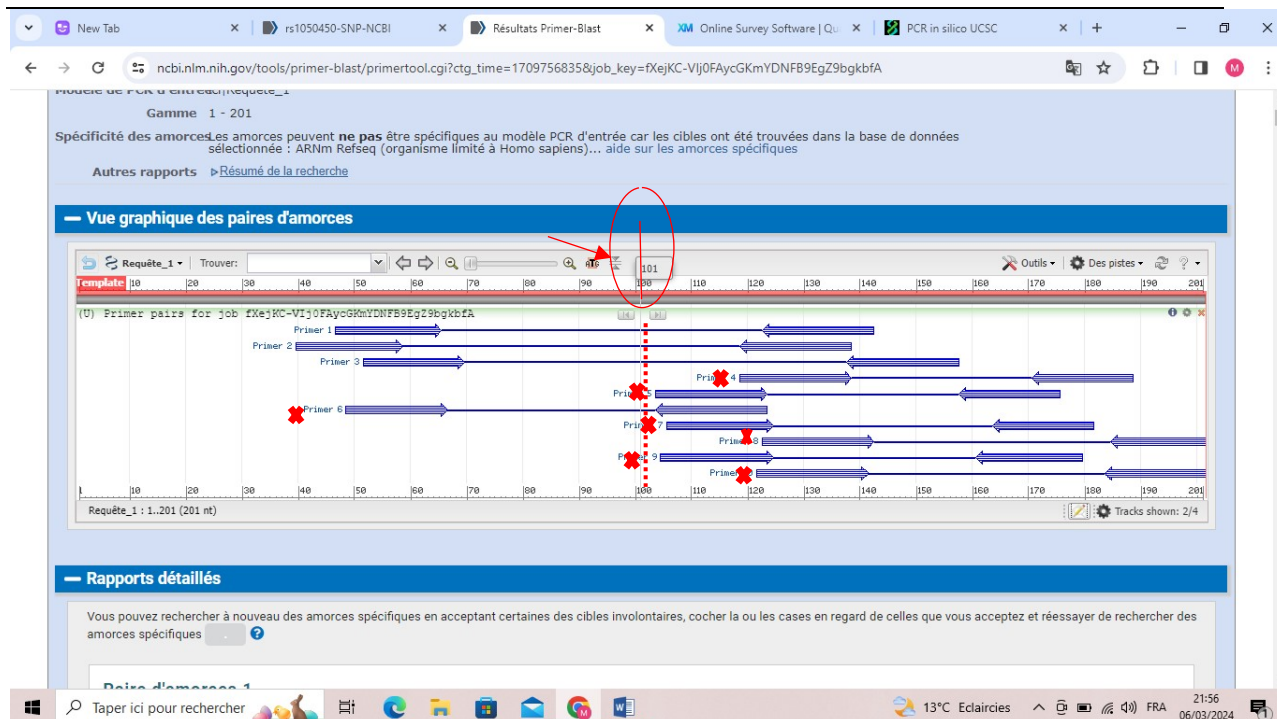


Figure 09 : Sélection des bonnes paires d'amorce

Le résultat a permis de sélectionner 3 paires d'amorces :

Le **tableau 1**, présente les 3 amorces choisies ainsi que leurs caractéristiques. Nous constatons que ces 3 amorces vérifient les critères de sélection des amorces qui sont : la longueur, la température de fusion et le contenu en GC.

Tableau 01 : Caractéristiques des 3 paires d'amorces choisies

	Séquence (5'»3')	Longueur	Tm	%de CG
Primer 1	Amorce avant CAGCACTGCAACTGGCAAG	19	60.01	57.89
	Amorce inverse TGACATCGAGGCCTGACATCG	20	59.90	55.00
Primer 2	Amorce avant GAGACAGCAGCACTGCAAC	19	59.43	57.89
	Amorce inverse ATCGAGCCTGACATCGAAGC	20	60.25	55.00
Primer 3	Amorce avant CTGCAACTGGCAAGCAGC	18	60.05	61.11
	Amorce inverse CCGCTTCCAGACCATTGACA	20	60.32	55.00

4. La vérification de la spécificité de ces 3 paires d'amorce :

Pour vérifier si ces 3 amorces suivent le dernier critère de sélection qui est la spécificité de la région à amplifier, on avait utilisé le site UCSC PCR in silico. Les séquences de chaque paire d'amorce (sens et anti-sens) avaient été introduites dans son emplacement spécifique comme le montre la **Figure 10**.



Figure 10 : Spécificité des amorces

Les résultats sont comme suit :

La 1^{ère} paire :

La **Figure 11** montre que la 1^{ère} paire n'est pas spécifique parce qu'elle amplifie une autre région dans le chromosome X.

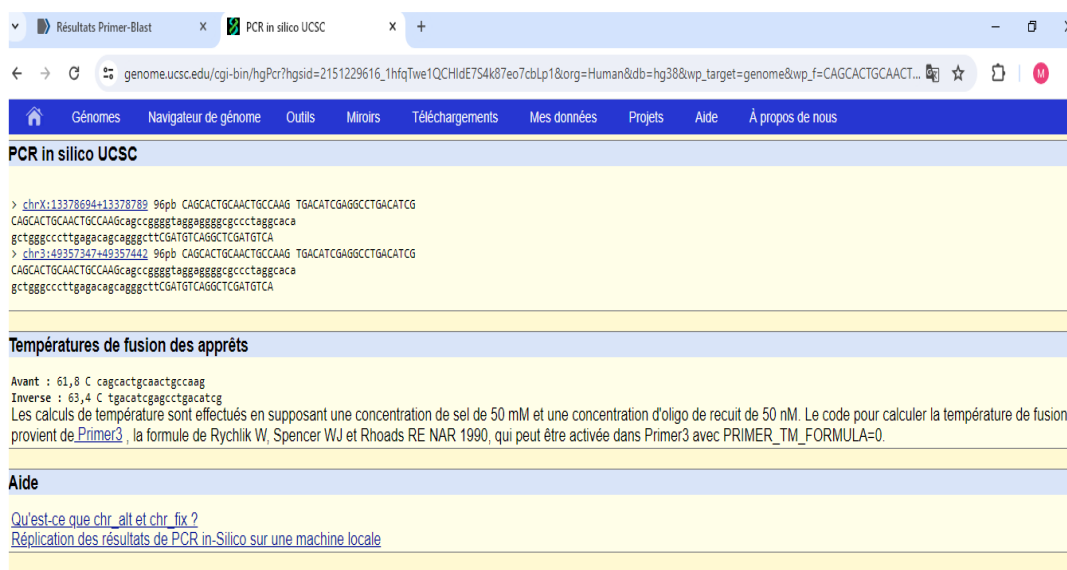


Figure 11 : Résultat de la 1^{ère} paire par UCSC In-Silico PCR

La 2^{ème} paire :

Le résultat montre que la 2^{ème} paire est plus spécifique car elle amplifie notre région d'intérêt dans le chromosome 3.

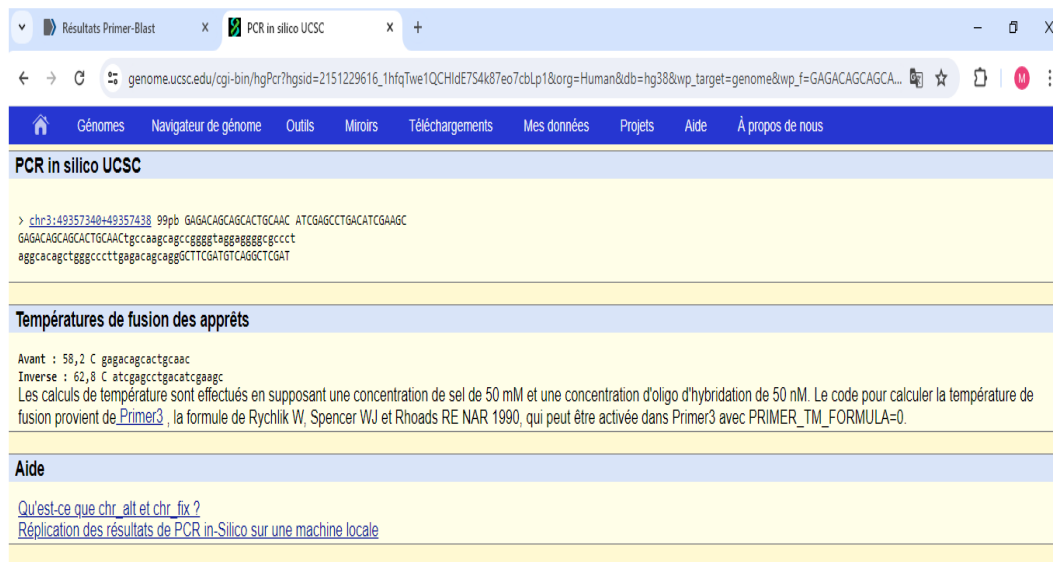


Figure 12 : Résultat de la 2^{ème} paire par UCSC In-Silico PCR

La 3^{ème} paire :

Notre résultat montre que la 3^{ème} paire n'est pas spécifique, car en plus d'amplifier la séquence d'intérêt, elle amplifie une autre région dans le chromosome X.

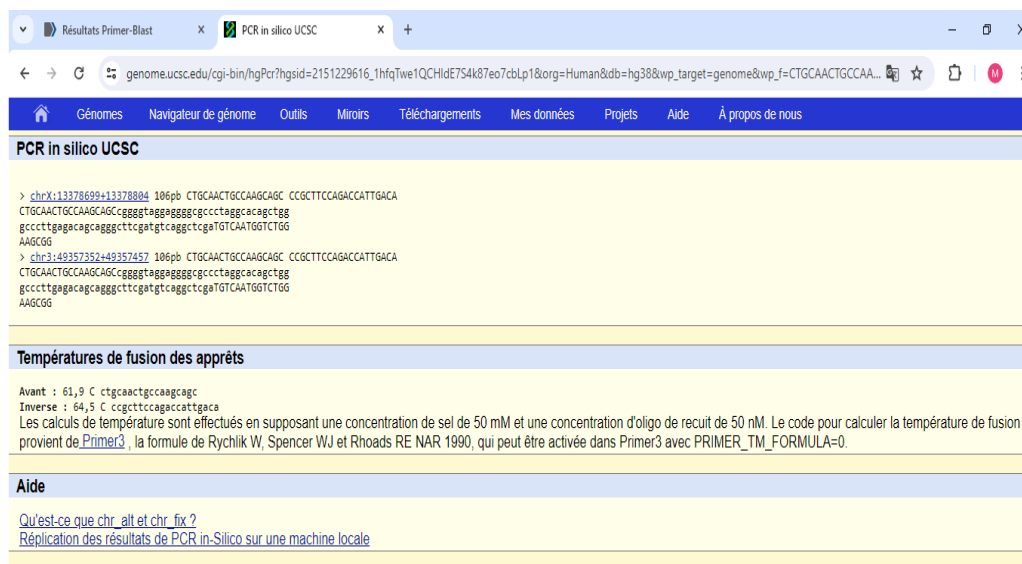


Figure 13 : Résultat de la 3^{ème} paire par UCSC In-Silico PCR

D'après ces critères, nous avons sélectionné de la 2^{ème} paire.

Tableau 02 : Les caractéristiques de la 2^{ème} paire d'amorce.

Primer 2	Amorce avant GAGACAGCAGCACTGCAAC	19	59.43	57.89
	Amorce inverse ATCGAGCCTGACATCGAAGC	20	60.25	55.00

Discussion et conclusion

Discussion :

Ce travail trouve son intérêt dans l'importance de construire et d'élaborer des amorces exactes afin d'amplifier la région d'ADN ciblée avec certitude, et d'éviter des amplifications ubiquitaires pouvant fausser les résultats.

La glutathion peroxydase 1 est une enzyme dépendante du sélénium qui est exprimée de manière ubiquitaire et protège les cellules contre les dommages oxydatifs en réduisant le peroxyde d'hydrogène et une large gamme de peroxydes organiques avec du glutathion réduit. Le polymorphisme rs1050450 est associé à une substitution de C par T dans l'exon 2 de la GPX1, ce qui entraîne le changement d'acide aminé proline (Pro) par leucine (Leu) au codon 198 (*Ratnasinghe , 2000*). Des auteurs suggèrent que ce changement pourrait provoquer des changements de conformation importants pour la GPx1, car la proline est le seul acide aminé sans groupe amino libre non substitué sur l'atome de carbone alpha (*Ratnasinghe , 2000*).

Des études menées sur l'homme n'appuient pas explicitement le lien fonctionnel entre le génotype GPX1 et l'activité de l'enzyme. Cependant certains auteurs ont constaté que l'activité de la GPX1 est significativement réduite pour l'allèle Leu par rapport à l'allèle Pro dans le cancer du sein et d'autres pathologies (*Ravn-Haren ,2006*). Cette corrélation a été observée chez les femmes diagnostiquées avec un cancer du sein ainsi que dans le groupe témoin. C'est dans ce sens que nous avons jugé intéressant, de concevoir des amorces pour le polymorphisme rs1050450 du gène GPX 1, qui pourront faire l'objet d'une étude au sein de notre population.

Plusieurs couples d'amorces ont été élaborés. Seul le couple qui a présenté une grande spécificité et a rempli toutes les conditions de sélection a été retenu.

Cette étape est indispensable à toute analyse de biologie moléculaire impliquant ce polymorphisme (PCR/Séquençage, RT/PCR ...).

Conclusion :

La première étape de l'étude de la variation génétique au niveau d'un gène consiste à élaborer des amorces, afin d'amplifier la région d'intérêt. Dans ce travail, l'objectif est de concevoir des amorces afin d'étudier le polymorphisme du gène GPX1. En effet, le SNP au niveau de l'exon 2 de la GPX1 et du rs1050450 qui modifie la séquence d'acide aminé (Pro/Leu) est associé à certaines maladies.

Parmi les couples d'amorces proposés par les bases de données, nous avons sélectionné celui qui présente une grande spécificité et remplit toutes les conditions requises pour une bonne amplification.

Comme perspectives et vu que le polymorphisme ciblé de la GPX1 n'ayant pas fait l'objet d'études au sein de notre population, il serait intéressant dans l'avenir d'élaborer des études d'association avec la survenue de différentes pathologies. Une étude dans laquelle la répartition des allèles de ce SNP serait comparée entre le groupe des cas (porteurs de la maladie), le groupe des témoins (contrôles) et l'allèle ancestrale, afin de mettre en évidence une éventuelle association entre les différents allèles de ce polymorphisme et la survenue de différents dysfonctionnements liés à une activité différente de l'enzyme antioxydante glutathion peroxydase.

Références bibliographiques

A

Arrasyid N , Milahayati Daulay², Mutiara Indah Sari³.2021. *Glutathione Peroxidase-1 Pro198Leu Variant in Tuberculosis-infected Type2 Diabetes Mellitus Patients at Pulmonary Polyclinic Medan. 1Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Universitas Sumatera Utara, Medan, Indonesia; 2Department of Physiology, Faculty of Medicine, Universitas Sumatera Utara, Medan, Indonesia; 3Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Universitas Sumatera Utara, Medan, Indonesia*

Ayyadevara S , J. J. Thaden, and R. J. Shmookler Reis. *Discrimination of primer 3'-nucleotide mismatch by taq DNA polymerase during polymerase chain reaction. Anal Biochem, 284(1) :11–8., 2000*

B

Brigelius-Flohé, R., Maiorino, M., 2013. *Glutathione peroxidases. Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj. 1830, 3289–3303. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020>*

Bigot A ,.2009. *Identification et étude de l'expression de gènes de détoxification chez les bivalves d'eau douce Uniotumidus et Corbicula fluminea : approches en laboratoire et en milieu naturel. THÈSE En vue de l'obtention du grade de Docteur ès sciences Mention « Toxicologie de l'Environnement »*

E

Eberhard passarge ;2003. *Atlas de poche de génétique .2^{ème} édition . flammariion Medecine Sciences .france , paris.*

Eléonore Chabory;2009. *Caractérisation fonctionnelle de la glutathione peroxydase 5 murine*

F

Forsberg L, de Faire U, Marklund SL, Andersson PM, Stegmayr B, Morgenstern R (2000) *Phenotype determination of a common Pro–Leu polymorphism in human glutathione peroxidase 1. Blood Cells Mol Dis 26:423–426*

H

Hatfield, D. L., Berry, M. J., and Gladyshev, V. N. (2006) *Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health*, 2nd Ed., Springer-Verlag New York Inc.,

J

Jun lu et al ,sélénoprotéine. *The journal of biological chemistry* vol .284 , NO .2PP.723-727

Jean-Philippe Vert. *Les applications industrielles de la bio-informatique. Réalités industrielles. Annales des mines*, 2013, Février 2013, pp.17-23. fihal-00796732ff

L

Len Xin Genet al , ...2007. *metabolic regulation and function of glutathioneperoxidase -1. Annual review of nutrition* , 27(1).41-61.

M

Meteoukki W ;2022. *Etude des déterminants génétiques des maladies oculaires dans l'Ouest Algérien cas du :kératocône. Thèse de Doctorat .Université des sciences et de la technologie d'oran*

P

Papp, L. V., Lu, J., Holmgren, A., and Khanna, K. K. (2007) *Antioxid. Redox Signal.* 9, 775–806

R

Randa.Sgaier ;2019. *Caractérisation des activités cytoprotectrices de molécules utilisées dans le traitement de la sclérose en plaques (diméthyle fumarate, monométhyle fumarate, biotine) sur des oligodendrocytes 158N : impact sur le stress oxydant, le statut mitochondrial, le statut lipidique, l'apoptose et l'autophagie. These de doctorat. Sciences Biologiques&Biotechnologiques. Université de Bourgogne Franche-comte.*

Ratnasinghe D, Tangrea JA, Andersen MR, Barrett MJ, Virtamo J, Taylor PR, Albanes D (2000) *Glutathione peroxidase codon198 polymorphism variant increases lung cancer risk. Cancer Res*60:6381–6383

Références Bibliographique

Ravn-Haren G, Olsen A, Tjønneland A, Dragsted LO, Nexø BA, Wallin H, Overvad K, Raaschou-Nielsen O, Vogel U (2006) Associations between GPX1 Pro198Leu polymorphism, erythro-cyte GPX activity, alcohol consumption and breast cancer risk in a prospective cohort study. Carcinogenesis 27:820–825

S

Samantha P. 27 Jan 2018. Méthode d'identification bactérienne par PCR quantitative appliquée à un modèle de biofilm oral pluri-espèces dynamique. DIPLOME d'ÉTAT de DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE Université de Bordeaux Collège des Sciences de la Santé UFR des Sciences Odontologiques.

Stoffaneller R et al ...2015 .A Review of Dietary Selenium Intake and Selenium Status in Europe and the Middle East. Nutrients 2015, 7, 1494-1537

Sobolev, O et al., (2018). Biological role of selenium in the organism of animals and humans. Ukrainian Journal of Ecology, 8(1), 654–665.

T

Tichati L ;2020. Etude de la cytotoxicité de l'acide 2,4 dichlorophénoxyacétique via l'exploration de l'état antioxydant et anti-inflammatoire chez le rat Wistar : effet prophylactique des antioxydants nature

Y

Yangjing Z; Wang, H.; Zhou, J.; Shao, Q. Glutathione Peroxidase GPX1 and Its Dichotomous Roles in Cancer. Cancers 2022, 14, 2560

Z

ZEKRI M .2015. Approches Bio-inspirées pour la Fouille de Données en Bioinformatique THESE Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat 3ème Cycle. BADJI MOKHTAR-ANNABA UNIVERSITY UNIVERSITE BADJI MOKHTAR-ANNABA

Résumé

La glutathion peroxydase est la protéine antioxydante la plus importante de la famille des sélénoprotéines. Elle permet de réduire et de détoxifier différents types de peroxydes en leur alcool correspondant, et ce aux dépens du glutathion. Elle constitue ainsi l'armure essentielle de l'organisme contre le stress oxydatif. La famille des glutathion peroxydases compte plusieurs membres, dont la glutathion peroxydase 1 (GPX1) qui est intracellulaire. Le gène GPX1 est localisé de manière ubiquitaire dans la région 3p21.31, au niveau du chromosome 3.

L'objectif de ce travail est de concevoir avec spécifié un couple d'amorce encadrant un SNP C/T, au niveau du rs1050450 de l'exon 2 de l'enzyme glutathion peroxydase 1, de façon à amplifier cet exon.

L'utilisation du Primer-BLAST nous a permis de concevoir plusieurs couples d'amorces d'une longueur d'environ 20 nucléotides. La spécificité de ces amorces a été vérifiée grâce à l'outil UCSC. Le couple d'amorce le plus spécifique, encadrant la région d'intérêt, a été retenu.

En biologie moléculaire, la bioinformatique représente une étape cruciale avant toute manipulation. La conception d'amorces permettra d'étudier l'implication d'un polymorphisme génétique dans la survenue d'une pathologie associée.

Mots clés : GPX1 ,exon 2, rs1050450 , amorces, amplification, SNP C/T.

Abstract

Glutathione peroxidase is the most important antioxidant protein in the selenoprotein family. It reduces and detoxifies various types of peroxides into their corresponding alcohols, at the expense of glutathione. It thus constitutes the body's essential armor against oxidative stress. The glutathione peroxidase family comprises several members, including the intracellular glutathione peroxidase 1 (GPX1). The GPX1 gene is ubiquitously located in the 3p21.31 region of chromosome 3.

The aim of this work is to design and specify a primer pair flanking a C/T SNP at rs1050450 of exon 2 of the glutathione peroxidase 1 enzyme, in order to amplify this exon.

Using Primer-BLAST, we were able to design several primer pairs of around 20 nucleotides in length. The specificity of these primers was checked using the UCSC tool. The most specific primer pair, flanking the region of interest, was selected.

In molecular biology, bioinformatics is a crucial step prior to any manipulation. The design of primers will make it possible to study the involvement of a genetic polymorphism in the occurrence of an associated pathology.

Key words: GPX1 ,exon 2, rs1050450 , primers, amplification, SNP C/T.

المخلص

يُعد الجلوتاثيون بيروكسيداز أهم بروتين مضاد للأكسدة في عائلة البروتين السيلينوبروتيني. فهو يقلل ويزيل السموم من أنواع مختلفة من البيروكسيدات إلى الكحوليات المقابلة لها، على حساب الجلوتاثيون. وبالتالي فهو درع الجسم الأساسي ضد الإجهاد التأكسدي. تضم عائلة الجلوتاثيون بيروكسيداز العديد من الأعضاء، بما في ذلك الجلوتاثيون بيروكسيداز 1 داخل الخلايا (GPX1). يقع جين GPX1 في كل مكان في منطقة 3p21.31 من الكروموسوم 3.

والهدف من هذا العمل هو تصميم وتحديد زوج تمهيدي يحيط بـ C/T SNP في rs1050450 من الإكزون 2 من إنزيم الجلوتاثيون بيروكسيداز 1، من أجل تضخيم هذا الإكزون.

باستخدام برايمر-بلاست، تمكنا من تصميم عدة أزواج من البادئات التي يبلغ طولها حوالي 20 نيوكليوتيدات. تم التحقق من خصوصية هذه البادئات باستخدام أداة UCSC. وتم اختيار الزوج التمهيدي الأكثر تحديداً الذي يحيط بالمنطقة محل الاهتمام.

في البيولوجيا الجزيئية، تعد المعلوماتية الحيوية خطوة حاسمة قبل أي معالجة. سيجعل تصميم البادئات من الممكن دراسة تورط تعدد الأشكال الوراثية في حدوث علم الأمراض المرتبطة به.

الكلمات المفتاحية: GPX1 ، exon 2 ، البادئات، التضخيم، SNP C/T .