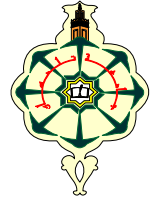




République Algérienne Démocratique et Populaire
**Ministère de l'Enseignement et de la Recherche
Scientifique**



UNIVERSITE DE TLEMEN- ABOU-BEKR BELKAID
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie

MEMOIRE

Présenté par

BELBACHIR NADJAT

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En immunologie

Thème

**conception d'amorces de gène
KIR associé à l'immunité anti-
tumorale**

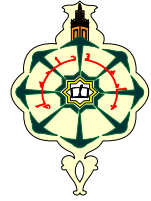
Soutenu le 08 /09 /2020, devant le jury composé de :

Président	Chahrazad ELMEZOUAR	MAA
Encadreur	Nabila BRAHAMI	MCA
Examinatrice	Wafa NOUARI	MCB

Année universitaire 2019 /2020



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



UNIVERSITE DE TLEMEN- ABOU-BEKR BELKAID
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie

MEMOIRE

Présenté par

BELBACHIR NADJAT

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En immunologie

Thème

**conception d'amorces de gène
KIR associé à l'immunité anti-
tumorale**

Soutenu le 08 /09 /2020, devant le jury composé de :

Président	Chahrazad ELMEZOUAR	MAA
Encadreur	Nabila BRAHAMI	MCA
Examinatrice	Wafa NOUARI	MCB

Année universitaire 2019 /2020

Résumé

Introduction. Les cellules naturelles tueuses (NK) font partie des grands lymphocytes granuleux (GLG) et présentent la première ligne de défense contre les cellules transformées par la présence de différents récepteurs fonctionnelles comme les récepteurs de types immunoglobulines tueuses (KIR) sont des glycoprotéines. La polymérase chaine réaction (PCR) est une technique enzymatique qui permet d'analyser et détecter les altérations des niveaux d'expression des gènes dans le cancer grâce à de bonnes paires d'amorces.

Objectif. Concevoir des amorces spécifiques au gène *KIR*, exprimé sur la cellule NK dans le cancer, en utilisant le logiciel Primer-BLAST.

Matériel et méthode. Nous avons lancé une étude bio-informatique afin de trouver la séquence génomique du gène *KIR* dans la base de données www.ensembl.org. A partir du National Center For Biotechnology Information (NCBI) nous avons utilisé le logiciel Primer-BLAST pour concevoir la bonne paire d'amorce du gène *KIR* et dans le but de confirmer leur spécificité ainsi que leur fiabilité, pour l'utilisation dans la technique PCR, nous avons soumis la paire d'amorces choisie à une confirmation de résultats par la PCR in -Silico.

Résultats. Dans les résultats donnés par le Primer-BLAST la paire d'amorce numéro 7 est celle qui présente les bonnes caractéristiques d'une paire d'amorce. Elle donnerait un produit d'amplification spécifique de 676pb qui correspond à l'exon5 Du gène *KIR*. Et donnerait des produits aspécifiques de taille supérieur à 1000pb, ce qui rend leur amplification impossible. Cette paire à une longueur de 20 bases et une température d'hybridation de 59°C ainsi qu'une teneur en GC de 50%.

Conclusion. La paire d'amorce choisie est spécifique et fiable pour faire une amplification de l'exon 5 du gène *KIR* par la technique PCR qui permet d'étudier l'expression du gène *KIR* et d'analyser les modifications de sa séquence, dans le cancer.

Mots clés

La cellule NK, gène *KIR*, Amorce, cancer, PCR.

Abstract

Background. Natural killer cells (NK) are part of the large granular lymphocytes (GLG) and present the first line of defense against cells transformed by the presence of different functional receptors as killer immunoglobulin-like receptors (KIRs) are glycoproteins. Polymerase chain reaction (PCR) is an enzymatic technique which allows the analysis and detection of alterations in the levels of gene expression in cancer thanks to good pairs of primers

Objective. Design primers specific to the KIR gene, expressed on the NK cell in cancer, using the Primer-BLAST software.

Material and method. We launched a bioinformatics study to find the genomic sequence of the KIR gene in the database www.ensembl.org. From the National Center For Biotechnology Information (NCBI) we used Primer-BLAST software to design the correct primer pair for the KIR gene, and in order to confirm their specificity as well as their reliability, for use in the PCR technique, we submitted the chosen primer pair for confirmation by in -Silico PCR.

Results. In the results given by the Primer-BLAST, primer pair number 7 is the one that has the right characteristics of a primer pair. It would give a specific amplification product of 676bp which corresponds to exon5 of the KIR gene. And would give non-specific products larger than 1000bp, which makes their amplification impossible. This pair is 20 bases long and has a hybridization temperature of 59 ° C and a GC content of 50%.

Conclusion. The primer pair chosen is specific and reliable for amplifying exon 5 of the KIR gene by the PCR technique which makes it possible to study the expression of the KIR gene and to analyze changes in its sequence in cancer.

Keywords

The NK cell, KIR gene, Primer, cancer, PCR.

ملخص

المقدمة. تعد الخلايا القاتلة الطبيعية (NK) جزءاً من الخلايا الليمفاوية الحبيبية الكبيرة (GLG) وتقدم خط الدفاع الأول ضد الخلايا المتحولة من خلال وجود مستقبلات وظيفية مختلفة مثل مستقبلات شبيهة بالجلوبيولين المناعي (KIRs) هي بروتينات سكرية. سلسلة البوليميراز التفاعلي (PCR) هي تقنية أنزيمية مما تسمح بتحليل واكتشاف التغيرات في مستويات التعبير الجيني في السرطان بفضل أزواج جيدة من البادئات.

الهدف. تصميم البادئات الخاصة بالجين KIR، الذي يوجد على سطح الخلية NK باستخدام برنامج Primer-BLAST

المواد والطرق. أطلقنا دراسة المعلوماتية الحيوية من أجل إيجاد التسلسل الجيني لجين KIR في قاعدة البيانات www.Ensembl.org. من المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI) استخدمنا برنامج Primer-BLAST لتصميم الزوج الصحيح من البادئات لجين KIR ومن أجل تأكيد خصوصيتها وموثوقيتها ، لاستخدامها في تقنية PCR أخضعنا زوج البادئات المختار لتأكيد النتائج بواسطة PCR –Silico.

النتائج. في النتائج التي قدمتها Primer-BLAST، فإن زوج البادئات رقم 7 هو الذي يحتوي على الخصائص الجيدة بالنسبة لزوج البادئات. سيعطي ناتج تضخيم محدد من 676pb والذي يتوافق مع exon5 من الجين KIR. وسيعطي منتجات غير محددة أكبر من 1000pb مما يجعل تضخيمها مستحيلاً. يبلغ طول هذا الزوج 20 قاعدة ودرجة حرارة التهجين 59 درجة مئوية وكذلك محتوى GC بنسبة 50%.

الاستنتاج زوج البادئات الذي تم اختياره محدد وموثوق به لتضخيم exon 5 من الجين KIR بواسطة تقنية PCR مما يجعل من الممكن دراسة التعبير عن الجين KIR وتحليل التغيرات في تسلسلها في السرطان.

الكلمات المفتاحية. الخلية القاتلة الطبيعية ، جين KIR ، البادئات ، السرطان ، PCR.

Je dédie ce mémoire :

A mes chers parents pour leurs sacrifices, leurs amours, leurs tendresses, leurs soutiens, et leurs prières tout au long de mes études.

A mon chère marie pour leur encouragement permanent et leur soutien moral tout au long de mon parcours universitaire.

Amon fit MOHAMMED

A mes chers frères (KHALED et MOHAMMED) et sœurs (AMINA, FOUZEYA, FADILA)

A tous les membres de famille BELBACHIR, BOUROUAHA, SAHRAOUI, BERAHOU.

A tous les voisins, les cousins et les amies que j'ai connus jusqu'à maintenant, Merci pour leurs amours.

BELBACHIR NADJAT

Nous tenons à remercier premièrement dieu, le plus puissant pour la puissance et la volenté qu'il nous a données.

Mes grands remerciements à mon encadreur Mme **BRAHAMI.N** pour leurs confiances et leurs efforts.

Mes chers remerciements à Me **ARIBI.M**, professeur responsable a la spécialité d'immunologie qui m'a donné la chance d'être un membre de la spécialité.

Je tiens remercie tous les membres de notre laboratoire.

Mes remerciements anticipes vont aux **membres du Master II Immunologie**.

Je dresse mes sincères remerciements aux membres de jury Mme **BRAHAMI**, Me **ELMEZOUARE**, Mme **NOUARI**.

Enfin je remercie Mes amies pour la réalisation de ce mémoire qui est été possible grâce aux leur aide sous forme d'un conseil ou documentation Melle **TAAYAT SOUHILA RAYENE**, **BENIAHIA FATIMA ZOHRA**, **AZZOUZ RANIA**.

Un grand merci à **mon chère marie** pour leur soutien.

Résumé	III
Abstract	IV
ملخص	V
Dédicace	VI
Remerciement	VII
Tables des matières	VIII
Liste des figures	IX
Liste des tableaux	X
Liste des abréviations	XI
Introduction	1
Chapitre 1. Revue de la littérature	3
1.1. La cellule NK	3
1.1.1. Origine et maturation	3
1.1.2. La localisation	4
1.1.3. Les sous populations	4
1.1.3.1. Sous population primaire	4
1.1.3.2. Sous population secondaire	5
1.1.3.3. Tolérante NK	5
1.1.3.4. Cytotoxique NK	5
1.1.3.5. NK régulant	5
1.1.4. Les fonctions	5
1.2. Les récepteurs de type immunoglobulines tueuses (KIR)	6
1.2.1. Définition	6
1.2.2. Les types	7
1.2.2.1. KIR activateur (KIRa)	7
1.2.2.2. KIR inhibiteur (KIRi)	7
1.2.3. La structure	8

1.2.3.1. Le gène KIR	8
1.2.3.2. Le génotype KIR	9
1.2.4. Le rôle	10
1.2.4.1. KIR activateur	10
1.2.4.2. KIR inhibiteur	10
1.2.5. Mutation et polymorphisme	10
1.3. Le cancer	11
1.3.1. Définition	11
1.3.2. L'immunité anti tumoral	12
1.4. Le rôle de KIR dans l'immunité anti tumoral	12
1.4.1. Le mode d'action de KIR activateur	13
1.4.2. Le mode d'action de KIR inhibiteur	13
1.4.3. La régulation de l'activité cytotoxique par le récepteur KIR dans le caner	14
1.5. La PCR	15
1.5.1. Définition	15
1.5.2. Le principe	16
1.5.3. Les étapes	16
1.5.6. Les applications	16
Problématique	17
Chapitre2. Matériels et méthodes	18
2.1. La recherche de la séquence de gène KIR	18
2.2. La conception des amorces pour la PCR	19
2.3. la sélection des amorces	20
2.3.1. La longueur de l'amorce	20
2.3.2. La température de fusion	20
2.3.3. La spécificité	20

2.3.4. Les séquences d'amorces complémentaires	20
2.3.5. La teneur en G/C	20
2.3.6. La séquence à l'extrémité 3'	21
2.4. Le design des primer	21
2.3.1. Définition de primer Blast	22
2.4.2. Les étapes de primer Blast	22
Chapitre3. Résultats	24
3.1. Résultat de la recherche de la séquence de gène KIR3DL3	24
3.2. Résultats de la conception d'amorce	24
3.2. Confirmation des résultats	25
Chapitre4.conclusion et perspective	27
Chapitre5.réfèrences bibliographiques	28

Figure1. Développement de la cellule naturelle tueuse (NK)

Figure2.le récepteur KIR activateur

Figure3.le récepteur KIR inhibiteur

Figure4.le récepteur KIR2DL4

Figure5.la distribution des clusters de gène KIR

Figure6 (A, B, C, D). Le mode d'action des récepteurs KIR

Figure7. Site ensembl.org

Figure8. Le gène KIR3DL3 à partir de site ensemble

Figure9. Description de gène KIR3DL3

Figure10.le site NCBI

Figure11.l'outil primer Blast

Figure12 La séquence d'intérêt dans le site Primer Blast

Figure13.les paramètres de vérification de la spécificité des paires d'amorces

Figure14.la séquence de gène KIR3DL3

Figure15. Les dix paires d'amorces

Figure16. Résultats du primer Blast

Figure17. Le forward et la reverse primer dans PCR in-Silico

Figure18. Confirmation des Résultats par le site UCSC in sillico PCR

Tableau1.les récepteurs KIR inhibiteurs et leurs ligands

Tableau2.les récepteurs KIR activateurs et leurs ligands

A

ADCC : cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps

C

CSH : cellule souche hématopoïétique

CMH-1 : complexe majeur d'histocompatibilité de type 1

D

DAP12 : protéine adaptatrice de signalisation transmembranaire

G

GLG : grands lymphocytes granuleux

GM-CSF : facteur de stimulation des colonies de granulocytes- macrophages

I

IL-18 : interleukine18

IL-15 : interleukine15

IL-2 : interleukine2

IL-8 : interleukine8

IFN - γ : interferon gamma

Ig: immunoglobuline

ITIM : des motifs inhibiteurs a la base de tyrosine immunorécepteur

ITAM : des motifs activateurs a la base de tyrosine immunorécepteur

IDO: l'indole amine 2.3 dioxygénase

ILC : cellule lymphoïde innée

K

KIR : récepteur de type immunoglobuline tueuse

KIRa : KIR activateur

KIRi : KIR inhibiteur

L

LB : lymphocyte

LT : lymphocyte T

L : longue domaine cytoplasmique

LRC : récepteur leucocytaire

LMA : lymphome myéloïde aigue

M

M.O : moelle osseuse

MTOC : centre d'organisation des microtubules

M Φ : macrophage

N

NK : cellule naturelle tueuse

NCBI : National Center For Biotechnology Information

O

OLS : organes lymphoïde secondaire

P

PCR : polymérase chaine réaction

PB : sang périphérique

PLC : progéniteur lymphoïde commun

PML : progéniteur lymphoïde multi potentiel

PGE2 : la prostaglandine

PsA : L'Antigène Prostatique Spécifique

S

S : court domaine cytoplasmique

SHP-1 et SHP-2 : des phosphatases contenant des domaines SH-1 et SH-2

SSC : la sclérodémie systémique

T

TNF α : facteur de nécrose tumorale

TLR : toll like récepteur

TGF- β 1 : le facteur de croissance transformant bêta-1

V

VHC : virus d'hépatite

VHB : virus d'hépatite

VPH : papillomavirus

VAV : facteur d'échange de nucléotides guanine

VR : la vasculaire rhumatoïde

Introduction

Introduction

Les cellules naturelles tueuses (NK) sont des lymphocytes de l'immunité innée et présentent la première ligne de défense contre la cellule transformée et induire l'apoptose des cellules malignes par un mécanisme cytotoxique où elles libèrent des perforines et granzymes (Crinier et al., 2020).

Elles se caractérisent par la présence de récepteurs de type immunoglobuline tueuses (KIR) qui sont des glycoprotéines transmembranaires capables de reconnaître le complexe majeur d'histocompatibilité de type 1 (CMH1) exprimé sur la cellule cible. On en distingue deux types, KIR activateur (KIRa) et l'autre inhibiteur (KIRi) et l'ensemble des signaux partagés par ces deux types déclenchent l'état active de NK (Augusto, 2016).

Le gène *KIR* est localisé sur le chromosome 19q13.4, ce récepteur est codé par 2 pseudogènes et 17 gènes (Marsh et al., 2003). Parmi les gènes KIR on trouve un cas exceptionnel c'est le *KIR2DL4* car il induit la libération des cytokines et signaler une activité cytotoxique de NK (Huth et al., 2016).

Les récepteurs KIR assurent une régulation de l'activité cytotoxique de NK au cours du cancer car la cellule maligne présente une faible expression de la molécule CMH1 ce qui la rend sensible à la cytotoxicité ou bien garde l'expression de CMH1 plus le ligand du récepteur activateur KIRa. La régulation de l'activité cytotoxique des NK dépend de la balance entre les signaux de deux types ; s'il y'a une expression importante de ligand activateur due à une attaque contre la cellule transformée ou bien le lien entre le KIRi et le CMH1 bloque la cytotoxicité.

Dans ce sens les chercheurs font des études pour la transplantation de la moelle osseuse (MO) chez les patients atteints lymphome myéloïde aigue (LMA) et confirment que l'absence de liaison entre KIRi et le CMH1 du receveur améliore l'activité cytotoxique contre les tumeurs (Romagné et al., 2009) (Li and Sun, 2018) ce qui induit une réponse anti tumorale efficace contre la cellule cancéreuse.

Dans le but d'analyser les niveaux d'expression des gènes dans les tissus où se trouvent des cellules cancéreuses on utilise la technique polymérase chaine réaction (PCR) qui est une technique enzymatique permettant d'amplifier l'ADN en plusieurs copies, c'est une technique importante en biologie moléculaire afin de produire une quantité suffisante d'ADN pour l'analyse moléculaire (Kalle et al., 2014).

Introduction

Cette étude a pour objectif de concevoir des amorces d'une partie du gène *KIR* par le logiciel Primer blast afin d'analyser l'expression du gène au cours de l'immunité anti tumorale, et ainsi choisir la bonne paire d'amorces pour cette analyse postérieure d'expression.

Chapitre1.Revue de la littérature

1.1. La cellule NK

1.1.1. Origine et maturation

Les cellules naturelles tueuses (NK) sont des éléments de l'immunité innée car elles représentent la première ligne de défense contre les tumeurs et les agents pathogène (Minetto et al., 2019).

Avec un pourcentage de 5% à 15% des lymphocytes du sang périphérique (PB) (Miller and Tanaka, 1979), c'est des cellules produite à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH) dans la moelle osseuse (MO) et se différencient par l'acquisition de certains marqueurs et récepteurs fonctionnelles (Vargas et al., 2011). De plus une grande partie de leur développement s'effectue dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS) en présence d'interleukine 15 (IL-15) , interleukine18 (IL-18) et interleukine 2 (IL-2) (Miller and Tanaka, 1979) .

Le développement des NK se déroule selon les étapes suivantes (Bozzano et al., 2017), premièrement Les cellules souches hématopoïétiques (SCH) se différencient en progéniteur lymphoïde multi potentiel (PML) qui par la suite deviendra un progéniteur lymphoïde commun (PLC) (Cichocki et al., 2019) ce dernier subira un engagement vers un précurseur de NK c'est le NKP avec une expression de CD122 et l'absence de CD3 et CD127 (Crinier et al., 2020), ce dernier va subir une maturation et présente CD56 c'est le NK immature (Vargas et al., 2011) qui deviens NK mature en présence de Tbet et Eomes ce qui est donne la naissance de NK fonctionnelle (Crinier et al., 2020).

Le CD56dim NK est caractérisé par la présence de nombreux récepteurs (KIR et CD56dim ainsi que CD16 et NKG2A et CD57) (Crinier et al., 2020) (figure1). Il est aussi capable de libérer des cytokines comme l'interféron gamma (l'IFN- γ) et le facteur de nécrose tumorale de type alpha (TNF α) aussi le facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages(GM-CSF) et des chimiokines et cytokines pro inflammatoires (CCL1,CCL2,CCL3 et CCL4 et CCL5) (Bozzano et al., 2017) ainsi que IL-8 (interleukine8) et IP-10 (CXCL10) (Fauriat et al., 2010).

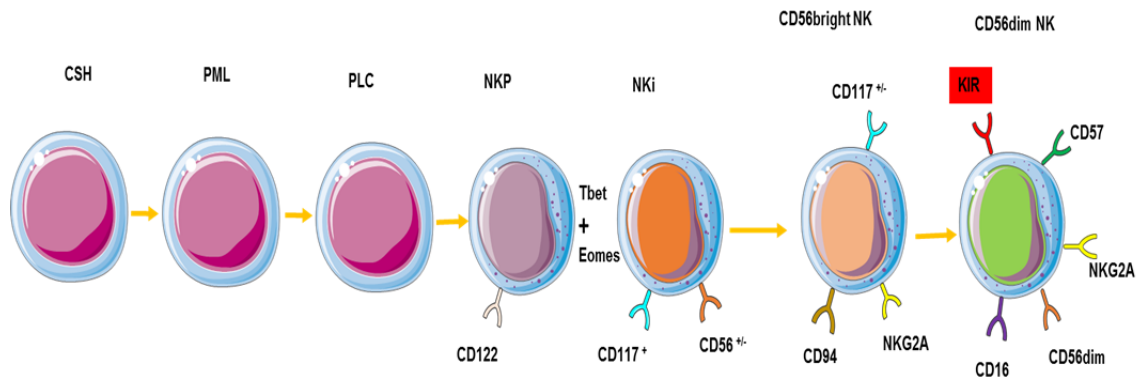


Figure1. Développement de cellule naturelle tueuse (NK)

Les cellules souches hématopoïétiques (SCH) se différencient en progéniteur lymphoïde multi potentiel (PML) qui par la suite deviendra un progéniteur lymphoïde commun(PLC)(Cichocki et al., 2019) ce dernier subira un engagement vers précurseur de cellule naturelle tueuse (NKP) qui donne ensuite la naissance des cellules naturelle tueuse immature(NKi) (Babor et al., 2013) en présence de Tabet et Eomes, expriment le CD117 et CD56^{+/-} après ce type va devenir plus mature appelée CD56^{bright} NK caractérisé par la présence de différentes récepteurs membranaires tels que les récepteurs CD94 et NKG2A à la fin CD56^{dim} NK qui présente (KIR et CD56^{dim} ainsi CD16 et NKG2A et CD57) ce qui exprime l'état fonctionnelle de NK en présence de la cellule cible(Crinier et al., 2020).

1.1.2. La Localisation

Les cellules NK sont des lymphocytes innés effecteurs identifiés, la première fois, en 1975, elles sont différentes des lymphocytes B (LB) et lymphocytes T (LT) (Hu et al., 2019), et elles sont trouvées dans les tissus secondaires et aussi les tissus primaires ainsi que dans les organes non lymphoïdes (Hu et al., 2019) et dans les poumons, le foie, l'intestin, les reins, la peau, l'utérus, les articulation et le sang périphériques (Crinier et al., 2020) avec 20% et 30% du total des lymphocytes hépatiques et 10% au niveau des poumons humains (Paul and Lal, 2017)

1.1.3. Les sous populations

En 1983 Lewis lanier est le premier qui a catégoriser les cellules NK en sous classes et les définir comme des population non homogènes grâce à une grande diversité des récepteurs (Fu et al., 2014). Sur la base d'expression de CD56 et CD16 on distingue deux grandes sous populations (Fu et al., 2014)

1.1.3.1 Sous population primaire

C'est les NK CD56^{dim} CD16⁺ localisés au niveau du sang leur rôle est de lyser la tumeur et présentent une cytotoxicité efficace.

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.1.3.2 Sous population secondaire

Caractérisés par le phénotype CD56^{bright}CD16⁻ et libèrent TNF α et l'IFN- γ (Mace and Orange, 2019)

D'autre part ces deux populations sont regroupées en 3 sous populations sur la base de la présence de CD11b et CD27 (Stoscheck and King, 1986) :

1.1.3.3 NK Tolérant c'est des NK^{lumineuses} CD56 ne possèdent ni CD11b ni CD27 (phénotype Immature de NK)

1.1.3.4 NK Cytotoxique c'est des NK CD56^{dim} et présentent le CD11b⁺

1.1.3.5 NK régulant c'est des NK^{lumineuses} avec CD27⁺

Actuellement les cellules NK sont considés appartenant à la famille des ILCs de type 1 car elles libèrent l'IFN- γ et TBX21 (Carlsten and Järås, 2019)

1.1.4. Fonctions des cellules NK

Les cellules NK sont identifiées par une capacité de défense contre les cellules cancéreuses sans sensibilisation préalable ce qui confirme leur importance dans la destruction des cellules infectés par les virus, des bactéries ou des parasites (Leischner et al., 2016).

Ces capacités confirment que les cellules NK sont des effecteurs cytotoxiques, d'autre part elles sont capables d'induire la mort cellulaire apoptotiques et nécrotiques par la libération des médiateurs tels que le perforine et le granzyme B (Crinier et al., 2020) et assurent une cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC) contre la tumeur, aussi elles sécrètent des cytokines et des chimiokines qui régulent la fonction d'autres cellules immunitaires (Olenik et al., 1991).

La cytotoxicité de la cellule NK se déroule en 4 étapes (Paul and Lal, 2017) :

1. La formation de synapse immunologique entre la cellule cible et la cellule NK
2. La polarisation du centre d'organisation des microtubules (MTOC) et lysosome sécrétoire vers une synapse lytique
3. Amarrage du lysosome sécrétoire vers la membrane plasmique
4. Fusion entre la membrane plasmique et la cellule cible

L'ensemble de ces étapes appelés la dégranulation ou il y'a la libération de perforine qui cause une polymérisation au sein de la cellule cible et forme des pores, qui vont aider l'entrer de granzyme B dans la cellule (Paul and Lal, 2017).

Chapitre1. Revue de la littérature

La cellule NK déclenche une inflammation par les récepteurs de type Toll (TLR2 et TLR3, TLR4 et TLR9) lors d'une infection bactérienne afin d'assurer une liaison entre les peptidoglycanes des bactéries en présence d'interleukine18 (IL-18) et l'interleukine2 (IL-2) sécrétés par le macrophage (MΦ), ainsi la cellule NK libère l'IFN- γ et active les cellules myéloïdes pour augmenter la phagocytose et détruire la bactérie (Poggi et al., 2019).

1.2. Les récepteurs de type immunoglobulines tueuses (KIR)

1.2.1. Définition

Sont des glycoprotéines transmembranaires présentes à la surface de la cellule NK (Kumar, 2018) et un sous ensemble de lymphocyteT (LT) (Babor et al., 2013) , c'est CD158(Marsh et al., 2003) avec un domaine extracellulaire de type immunoglobuline (Ig) et elles sont liées avec CMH1 de type (A,B et C) (Liu et al., 2019) (**tableau1, tableau2**) et se divisent en KIR inhibiteur (KIRi) et KIR activateur (KIRa) (Paul and Lal, 2017). L'ensemble des signaux que partagent ces deux types de KIR déclenchent l'état d'activation de la cellule NK.

Tableau1 : Les récepteurs KIR inhibiteurs et leurs ligands(Cooley et al., 2018),

récepteurs	ligands
KIR2DL1	HLA-C2
KIR2DL2	HLA-C1
KIR2DL3	HLA-C1
KIR2DL5	Pas connue
KIR3DL1	HLA-A et B
KIR3DL2	HLA-A3 et A11
KIR3DL3	Pas connue

Tableau2 : les récepteurs KIR activateurs et leurs ligands(Baumeister et al., 2020)

récepteurs	ligands
KIR2DS1	HLA-C2
KIR2DS2	HLA-A11
KIR2DS3	Pas connue
KIR2DS4	HLA-A11
KIR2DS5	HLA-C2
KIR3DS1	HLA-F
KIR2DL4	HLA-G

1.2.2. Les types des récepteurs KIR

Les récepteurs KIR se divisent en deux catégories distinctes selon la longueur de la queue cytoplasmique, le nombre de domaines et les motifs qui se trouvent dans la queue cytoplasmique.

1.2.2.1. KIR activateur (KIRa)

Ce type possède un court domaine cytoplasmique (S) qui interagit avec une protéine adaptatrice de signalisation transmembranaire (DAP12) (Ghanadi et al., 2016) (**figure2**). Ce type comprend ; KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5 et KIR3DS1 (Sugioka et al., 2016) chaque sous type est lié à un ligand spécifique.

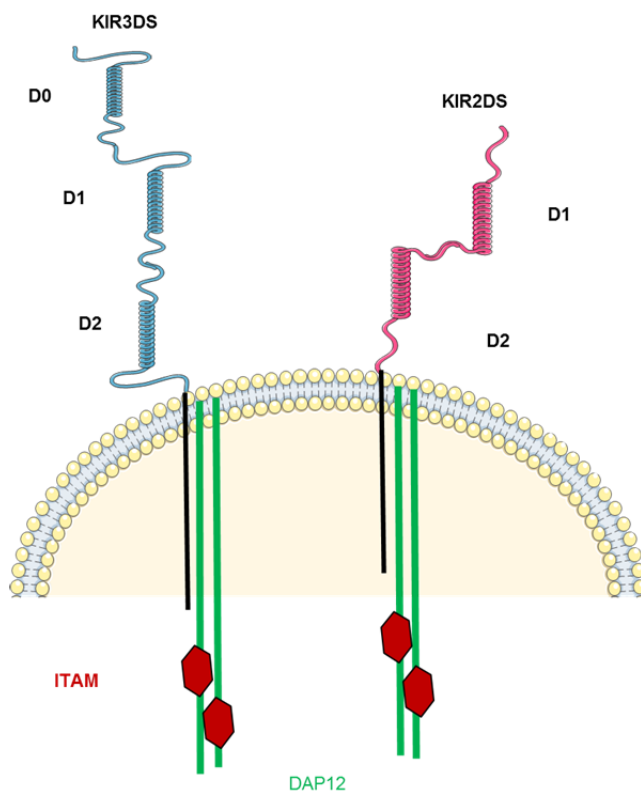


Figure2. le récepteur KIR activateur

Les récepteurs de type immunoglobulines à cellules tueuses activateurs (KIRa) contiennent des domaines exprimés sur la région extracellulaire 2D pour deux domaines et 3D pour trois domaines et courts domaines cytoplasmiques liés à une protéine adaptatrice de signalisation transmembranaire (DAP12) appelée KARAP. L'activation de la voie de signalisation dépendante de DAP12 s'effectue par le recrutement de tyrosine kinases Syk / ZAP-70 grâce à des motifs d'activation à base de tyrosine d'immunorécepteurs (ITAM)(Campbell and Purdy, 2011)

1.2.2.2. KIR inhibiteur (KIRi)

Chapitre1. Revue de la littérature

Le récepteur KIRi connue par la présence d'une longue queue cytoplasmique (L) contenant des motifs inhibiteurs à base de tyrosine immunorécepteur (ITIM) (Schwartz et al., 2019) (**figure3**), ces motifs phosphorylés par la protéine tyrosine phosphatase (SHP-1) provoquent une voie de signalisation qui induit l'arrêt de la fonction cytolytique de NK(Schwartz et al., 2019). Ce type comprend ; KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL5, KIR3DL1, KIR3DL2 et KIR3DL3.

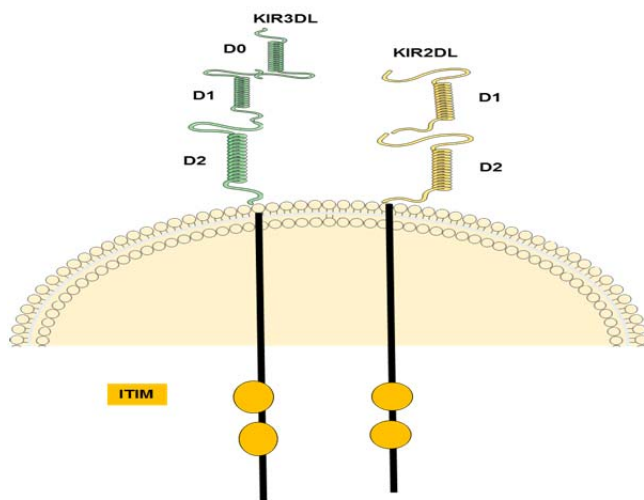


Figure3.récepteur KIR inhibiteur

Les récepteurs de types immunoglobulines inhibiteurs présentent des domaines extracellulaires de types immunoglobulines de type C dans la région extracellulaire 2D pour deux domaines et 3D pour 3 domaines ainsi caractériser par des longs domaines cytoplasmiques où il Ya des motifs inhibiteurs à base de tyrosine immunorécepteurs (ITIM)qui recrutent des protéines tyrosine phosphatases qui sont importantes pour la médiation de la fonction inhibitrice (Campbell and Purdy, 2011)

1.2.3. Le gène *KIR*

La localisation du gène *KIR* se trouve dans le récepteur leucocytaire (LRC) au niveau du chromosome 19q13.4 dans une région de 150Kb (Marsh et al., 2003) et se compose d'un domaine transmembranaire, de régions promotrices et d'autres domaines cytosoliques.

Chapitre1. Revue de la littérature

Le récepteur *KIR* est codé par 17 gènes et 2 pseudogènes (*KIR3DP1* et *KIR3DP2*) ayant une fonction inconnue (Campbell and Purdy, 2011) ainsi la nomenclature du gène *KIR* est basée sur le nombre de domaines dans les régions extracellulaires et la longueur du domaine cytoplasmique (Schwartz et al., 2019).

Cas exceptionnelle pour le gène *KIR2DL4* qui possède une longue queue cytoplasmique avec un seul motif ITIM et a acquis le caractère d'un KIRi (Augusto et al., 2013) qui s'associe au motif ITAM contenant l'adaptateur DAP12 via un acide aminé chargé (lysine) dans leur domaine transmembranaire avec un autre acide aminé chargé (arginine) ce qui confère à *KIR2DL4* la capacité de s'apparier avec la chaîne γ de Fc ϵ R1 (**figure4**) et d'induire la libération de cytokines et signaler une cytotoxicité, quand elle est présentée à la surface cellulaire (Augusto et al., 2013).

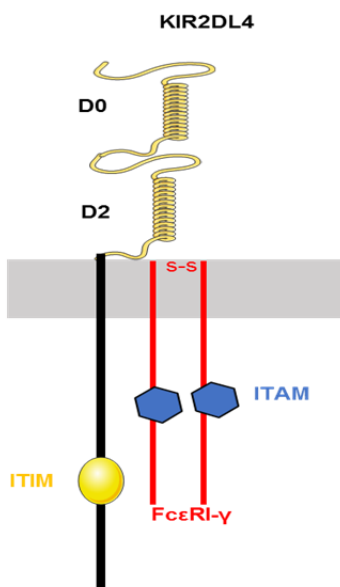


Figure4 : le récepteur KIR2DL4

Ce récepteur c'est la seule qui eu une longue queue cytoplasmique(L) et acquérir le caractère d'inhibiteur avec un seul motif inhibiteurs à base de tyrosine immunorécepteurs (ITIM) et fonctionne comme un activateur et se lier avec l'adaptateur Fc ϵ RI- γ contenant des motifs d'activation à base de tyrosine d'immunorécepteurs (ITAM) a la place d'une protéine adaptatrice de signalisation transmembranaire (DAP12)(Augusto et al., 2013)

1.2.3.1. Le génotype *KIR*

Le gène *KIR* comprend 614 allèles en plus des 17 gènes ce qui divise le génotype en deux haplotypes A et B (Huth et al., 2016) (**figure5**) et présente une diversité génétique à la fois sur la base d'une variation et en fonction du contenu génétique et selon le nombre de copies du gène (Wagner et al., 2018).

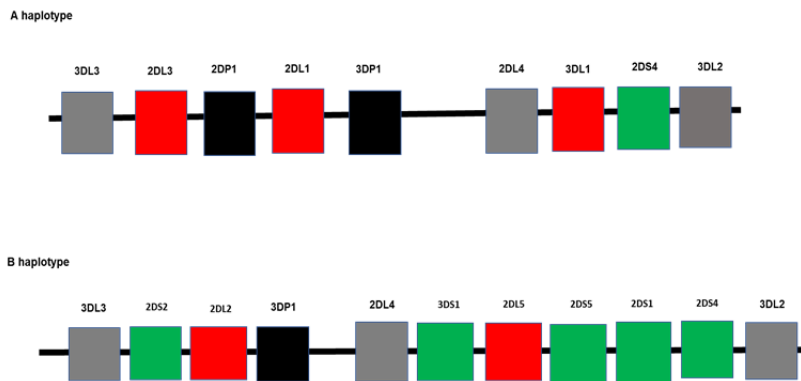


Figure5 : la distribution des clusters de gène KIR

Le génotype des récepteurs de type immunoglobulines tueuses (KIR) organise sous forme de deux haplotypes (A et B) (Huth et al., 2016) pour le type A présente 9 clusters de gène KIR et 11 gène clusters pour B haplotype et pour les gènes inhibiteurs représentés par des cases rouges et concernant les gènes activateurs sont représentés en vert aussi des pseudogènes indiqués par des cases noires et autres grises représentés les gènes charpente (Middleton and Gonzelez, 2010) et les distances entre les gènes sont environ 2Kb sauf la région de 14Kb en amont de gène KIR2DL4. (Li et al., 2008)

1.2.4. Le rôle

L'état d'activation de la cellule NK contre les cellules néoplasiques est déclenché à cause des signaux que partagent les deux types de KIR (Augusto, 2016) reconnaissant la cellule cible par le CMH1 et module les fonctions de NK par deux façon.

1.2.4.1. KIR activateur

Les récepteurs KIR activateurs capables de reconnaître les cellules infectées ou bien tumorales qui expriment une faible expression de CMH1 et provoque l'activation de la cellule NK qui libère des cytokines et active une cytotoxicité (Garner and Ashton, 1970).

1.2.4.2. KIR inhibiteur

Ce type permet de reconnaître les auto CMH de la cellule cible normale et cause un état de repos de la cellule NK s'exprimant par l'arrêt de l'activité cytotoxique et une tolérance de NK envers la cellule normale (Purdy and Campbell, 2009).

1.2.5. Mutations et polymorphismes du gène KIR

Le polymorphisme c'est le plus grand contributeur de la diversité du gène KIR (Ordóñez et al., 2008a) avec 907 allèles récemment définis (Wagner et al., 2018).

Chapitre1. Revue de la littérature

Les gènes du récepteur *KIR* et HLA se trouvent dans des chromosomes différentes 19 et 6 respectivement (Amorim et al., 2018) ce qui indique que le polymorphisme n'est pas commun entre tous les individus et induit une diversité génomique dans la population qui atteint plusieurs niveaux dans l'espèce humaine (Gagne et al., 2009).

Le polymorphisme du gène *KIR* qui varie entre les individus d'une part (Gagne et al., 2009) (Ordóñez et al., 2008b), et l'hétérogénéité au sein de la cellule NK d'autre part, conduisent à un grand polymorphisme allélique du gène *KIR* (63 allèles pour *KIR3DL1*) et l'autre haplotypique 16 gènes et pseudogènes (David et al., 2009).

Le gène *KIR* est polymorphe (Wagner et al., 2018) en fonction des facteurs génétiques et affecte la fonction et le phénotype de la cellule NK (Maniangou et al., 2017). La diversité au niveau du gène *KIR* varie car elle évoluée par mutations ou recombinaisons rapidement.

Le gène *KIR* est associé avec certaines maladies auto-immunes tels que la vascularite rhumatoïde (VR) et L'Antigène Prostatique Spécifique (PsA) aussi la sclérodermie systémique (SSC), pour le PsA le *KIR2DS2* et *KIR2DS3* ne sont associé à la maladie que s'il ya l'absence de ligand pour le KIR inhibiteur, cependant dans le RV il y'a une fréquence élevée de ligand pour le *KIR2DL3*. (Lowe et al., 2009)

Parmi les récepteurs KIR les plus étudiier c'est *KIR2DS2* (Momot et al., 2004) qui joue un rôle protecteur dans la transplantation de la MO et le sang du cordon pour divers tumeurs hématologiques et capable de reconnaître directement le peptide d'hélicase virale dans la molécule HLA.

1.3. Le cancer

1.3.1. Définition

C'est une maladie d'ADN endommagé à cause des mutations génétiques (PDQ Screening and Prevention Editorial Board, 2002) avec une prolifération anormale et non régulée de l'un des différentes types cellulaire.

L'ensemble des mutations provoquent une état inactif des gènes supresseurs de la tumeur et activent les oncogènes (PDQ Screening and Prevention Editorial Board, 2002), la tumeur peut être maligne capable de se déplacer et détruire d'autres tissus normaux et se propager dans tout le corps c'est la métastase, ou bien bénigne qui reste à sa place d'origine ne touche pas les autres tissus(Cooper, 2000).

Les agents cancérogènes les mieux connus sont ; le virus de l'hépatite C (VHC), virus d'hépatite B (VHB), papillomavirus (VPH) (Nagai and Kim, 2017),les rayons nucléaires, les

Chapitre1. Revue de la littérature

rayons électromagnétiques, les champignons, les produits chimiques et les radicaux libres(Sharma et al., 2010) , ce qui est donne la naissance à différents types du cancer tels que le cancer colorectale, cancer du sein, cancer du poumon, et cancer de la prostate (Nagai and Kim, 2017) .

Dans un microenvironnement tumorale on trouve des cytokines et métabolites immunosuppresseurs comme l'adénosine, le facteur de croissance transformant bêta 1 (TGF- β 1), la prostaglandine (PGE2) et l'indole amine 2.3 dioxygénase (IDO) (Daher and Rezvani, 2018) (Nagai and Kim, 2017).

1.3.2. L'immunité anti tumorale

C'est l'ensemble d'états critiques qui définit un cycle immunitaire contre la tumeur (PDQ Screening and Prevention Editorial Board, 2002) (Vermaelen, 2019) qui se déclenche suite à l'activation du système immunitaire par l'antigène tumorale et implique les composants de l'immunité innée et adaptative (Munhoz and Postow, 2016).

L'immunosurveillance est instauré afin d'augmenter la capacité de reconnaître et éliminer les cellules cancéreuses (Nagai and Kim, 2017) (Cook et al., 2018) et dans le but de renforcer la réponse anti cancéreuse la thérapie immunitaire recherche d'attirer les cellules immunitaires dans le microenvironnement tumorale (Nagai and Kim, 2017) (Cook et al., 2018).

Actuellement l'immunothérapie basée sur la biologie de la cellule NK et la thérapie génétique qui vise à modifier les cellules NK et le blocage des points de contrôles de NK ainsi que l'utilisation de nouvelles thérapies (Li and Sun, 2018).

1.4. Le rôle de KIR dans l'immunité antitumorale

La cellule NK instaure une réponse immunitaire efficace contre la cellule tumorale qui se déroule en plusieurs mécanismes d'immunosurveillance (Durbin, 1975) dans le but de détruire la cellule cancéreuse de façon non spécifique (Purdy and Campbell, 2009), afin d'éviter ainsi la propagation rapide des cellules tumorales et contrôler leur croissance en présence des récepteurs de type immunoglobulines tueuses *KIR* (Durbin, 1975).

Ces récepteurs KIR sont capable de distinguer entre la cellule saine et la cellule cancéreuse ou bien infectée, puis la cellule NK induit une activité cytotoxique où elle libère des perforines et granzymes qui causent l'apoptose de la cellule cible par Fas /FasL (van Son et al., 1985) .

Les récepteurs KIR jouent un rôle essentiel dans l'immunité anti tumorale orchestrée par la cellule NK, ils protègent les cellules normales et attaquent les cellules tumorales grâce à des signaux partagés par les deux types de KIR (Bi and Tian, 2019).

1.4.1. Le mode d'action de KIR activateur

Les récepteurs KIR activateurs transmettent des signaux *via* leur partenaire de signalisation (DAP-12), les kinases de la famille des Src phosphorylent les résidus tyrosines présents dans les motifs ITAM après la liaison d'un récepteur à son ligand exprimé sur la cellule tumorale en suite les ITAM phosphorylés recrutent les kinases ZAP-70 et les Syk (Durbin, 1975).ce qui est provoqué une activation de la cellule NK qui libère des cytokines anti tumorales et des perforines et granzymes afin d'éliminer la cellule cible (**figure6B**).

1.4.2. Le mode d'action de KIR inhibiteur

L'engagement des récepteurs *KIR* inhibiteurs avec leurs ligands appropriés (CMH-I) sur la cellule cible entraine une phosphorylation des motifs ITIM présents dans leurs longues queues cytoplasmiques par les kinases de la famille des Src(Durbin, 1975).

Les tyrosines phosphorylées dans les ITIM recrutent des phosphatases contenant des domaines SH-2 tels que SHP-1 et SHP-2 qui déphosphorylent Vav et d'autres molécules impliquées dans l'activation des cellules NK. Aussi, les signaux médiés par les KIR inhibiteurs bloquent l'activation des cellules NK et empêchent la lyse des cellules tumorales (Iannello et al., 2007) et d'autres part induire une tolérance vers les cellules normales(**figure6A**).

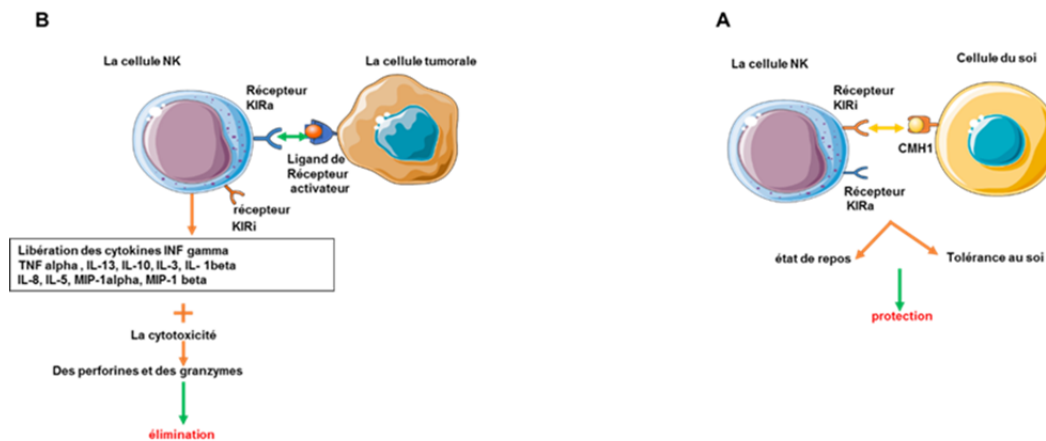


Figure6 : le mode d'action des récepteurs KIR

Figure 6A : la cellule normale exprime le complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1(CMH1) sur sa surface ce dernier reconnue par les récepteurs de type immunoglobulines à cellule tueuses de type inhibiteurs (KIRi) et n'exprime pas un ligand pour les récepteur activateurs (KIRa). Dans ce cas la cellule est protégée de la cytotoxicité de naturelle tueuses (NK) qui est dans un état de repos et il Ya une tolérance du soi. (Purdy and Campbell, 2009)

Figure 6B : la cellule cancéreuse caractériser par la perte d'expression de complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 (CMH1) et exprime un ligand pour le récepteur de type immunoglobuline activateur (KIRa) et levée le signal pour le récepteur inhibiteur (KIRi). Dans cette situation la cellule cancéreuse devenir sensible a la cytotoxicité de cellule naturelle tueuses (NK) et à cause de l'association des plusieurs cytokines anti tumorale tels que le facteur de nécrose tumorale de type alpha (TNF α) et des perforines et granzymes libérées par les cellules naturelles tueuses (NK), la cellule cible subir une élimination. (Campbell and Purdy, 2011)

1.4.3. La régulation de l'activité cytotoxique par le récepteur KIR dans le caner

La cellule tumorale présente une faible expression de la molécule de CMH-1 ou bien son absence ce qui est rend sensible à la cytotoxicité médiée par les cellules NK par contre dans des cas exceptionnels ou certains types de cancer, les cellules gardent l'expression de CMH-1 en plus de l'expression de ligand activateur pour le KIRa. Donc le déclenchement de la cytotoxicité contre la cellule maligne dépendante de la balance entre les deux types de KIR et dans ce sens, on distingue deux cas de le signalisation anti cancéreuse. Dans la première situation le signal inhibiteur est dépassé à cause d'une expression importante de ligand activateur et résulte une attaque contre la cellule cancéreuse (**figure6C**). Dans le deuxième cas la reconnaissance entre le CMH-1 et le récepteur KIRi induit un signal inhibiteur suffisant pour bloquer la cytotoxicité contre la cellule tumorale (**figure6D**).

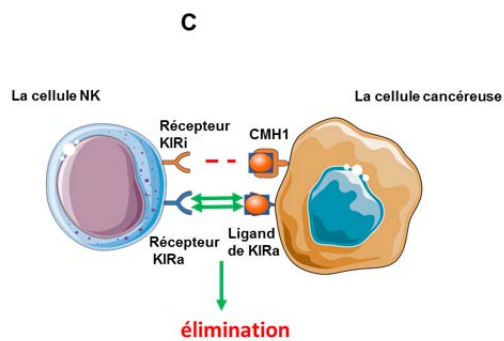


Figure 6C : la cellule cible garde l'expression de complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 (CMH1) malgré la transformation maligne avec l'expression de ligands de récepteurs de type immunoglobuline a cellule naturelle tueuse activateur (KIRa), l'activation de cellule naturelle tueuse (NK) dépendante le balance entre les deux types des signaux inhibiteurs et activateurs(Dahlberg et al., 2015) dans ce cas il Ya un déclenchement de la cytotoxicité a cause d'une diminution d'expression de CMH1 et une importante expression de ligands activateurs (Bachanova and Miller, 2014).

D

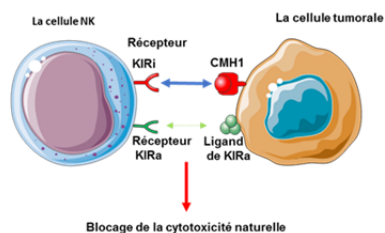


Figure 6D : dans la deuxième cas la cellule cancéreuse présente une expression importante de complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 (CMH1) reconnue par les récepteurs de type immunoglobuline a cellule naturelle tueuse inhibiteur (KIRi), ce signal est suffisant afin de stopper le signal activateur (KIRa) et bloquer la cytotoxicité de cellule naturelle tueuse (NK) (Dahlberg et al., 2015).

1.5. Technique de la réaction de polymérisation en chaîne

1.5.1. Définition

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) utilisée pour la première fois par Kary Mullis en 1983 (Valones et al., 2009) qui a reçus le prix Nobel en 1998 en chimie (Maheaswari et al., 2016), est une technique enzymatique qui amplifie l'ADN en plusieurs copies (Garibyan and Avashia, 2013).

L'ADN à amplifier est extrait à partir de différents tissus et organismes (les poumons, le sang ...). Elle a une grande importance dans la biologie moléculaire afin de produire une quantité suffisante d'ADN pour l'analyse (Kalle et al., 2014).

1.5.2. Le principe

Chapitre1. Revue de la littérature

C'est une technique réalisée in vitro à des fins d'amplification et d'étude de la séquence d'ADN obtenu à partir de la salive, du sang ou de la peau (Maheaswari et al., 2016).

- L'ADN polymérase effectue la réplication d'ADN et assure la liaison entre les nucléotides pour former le produit de la PCR (Maheaswari et al., 2016)
- La matrice c'est la séquence cible avec une longueur de 100 à 1000 Kb (Ghannam and Varacallo, 2020)
- Les amorces sont des séquences courtes simple brin complémentaire à l'ADN cible qui comporte l'acide nucléique cible (Valones et al., 2009)
- Les nucléotides libres (A-T-G-C) (Maheaswari et al., 2016)

Tous ces composants sont mélangés dans un seul tube à essai et placés dans un thermocycleur (Valones et al., 2009).

1.5.3. Les étapes

1. la dénaturation de la matrice d'ADN double brin à 92°C- 95°C afin d'obtenir de l'ADN simple brin (Gupta, 2019).

2. A une température de 50°C à 58°C, hybridation d'une paire d'amorces avec l'ADN cible dénaturé dans un site spécifique (Maheaswari et al., 2016).

3. Extension de la séquence d'ADN à 72°C (Gupta, 2019).

La technique de la PCR répété environ 30 jusqu'à 40 fois ce cycle des trois étapes, citées plus haut (Maheaswari et al., 2016).

1.5.6. Les applications

C'est une technique appliquée dans le clonage spécifique d'un fragment d'ADN, afin d'en obtenir plusieurs copies, pour étudier et analyser la séquence des gènes (Valones et al., 2009), afin de diagnostiquer les maladies infectieuses mais aussi dans le but d'analyser les altérations des niveaux d'expression des gènes dans le cancer (Ghannam and Varacallo, 2020) et les cas pathologiques de maladies potentiellement génétiquement transmissibles (Valones et al., 2009).

Problématique

Problématique

Afin d'étudier l'expression du gène KIR dans les cellules NK en association avec une immunité anti tumorale dans le cas du cancer nous avons commencé par la conception des amorces du gène *KIR* par le Primer-BLAST. Les amorces qui présentent les caractéristiques pour donner de bons produits d'amplification par PCR seront choisie pour une étude ultérieure et monter l'expression génétique de KIR sur la cellule NK lors du contrôle du cancer.

Objectif

Concevoir des amorces spécifiques à partir de la séquence génomique du gène *KIR*, en utilisant le logiciel Primer-BLAST.

But

Obtenir la bonne paire d'amorce pour la technique PCR afin d'étudier l'expression de gène KIR en association avec l'immunité anti tumorale.

Chapitre2. Matériels et méthodes

Chapitre2. Matériels et méthodes

2.1. La recherche de la Séquence du gène *KIR*

La conception d'amorce commence par la recherche de la séquence de référence du gène *KIR* qui a été introduire dans la base de données « Ensembl », cette plateforme est utilisée grâce au site « www.ensembl.org » où on va inscrire le nom du gène *KIR* chez l'espèce humaine comme montré dans la figure7.

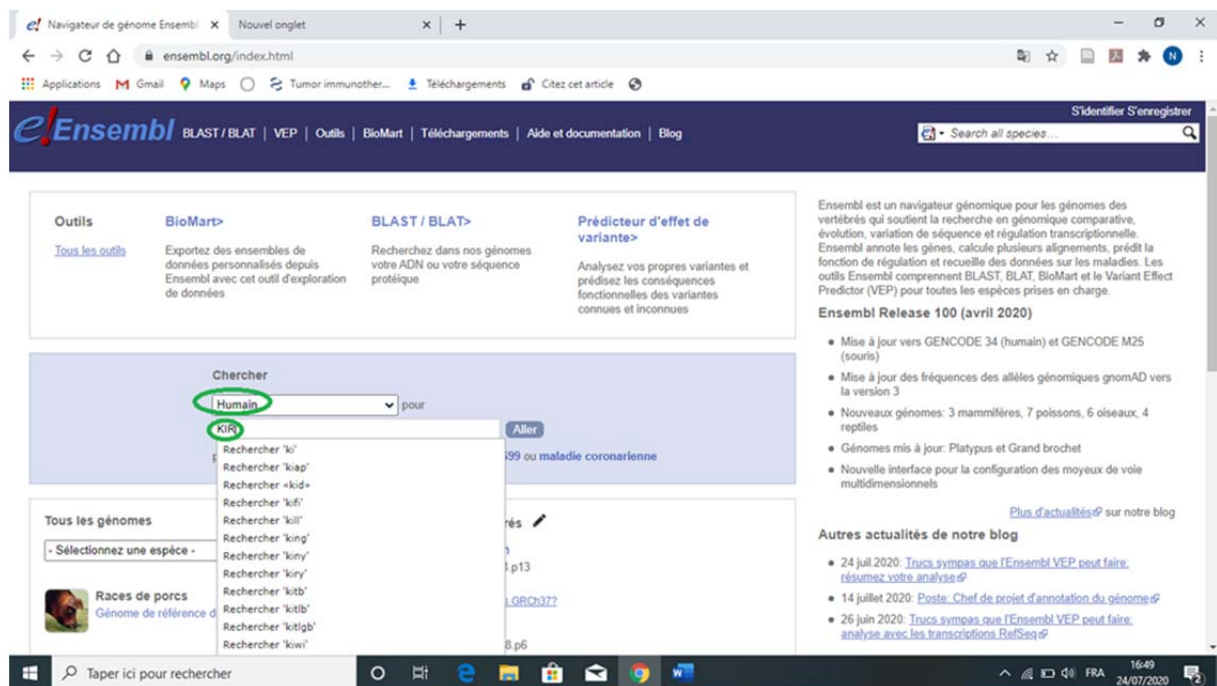


Figure7. Site ensembl.org de la base de données Ensembl

- ❖ Puis la plateforme montre plusieurs séquences de différents types de gène KIR mais avec des séquences alternatives ou bien transcrits et dans notre pratique il faut choisir la séquence du gène humain donc parmi les séquences on trouve deux gènes qui ont une séquence du gène humain le *KIR3DL3* et l'autre est un pseudogène le *KIR3DP1* (figure8) qui a une fonction inconnue dans ce sens on choisit le gène *KIR3DL3* qui est une séquence se trouve sous le nom du ENSG0000024019 (figures 9)

Chapitre 2. Matériels et méthodes

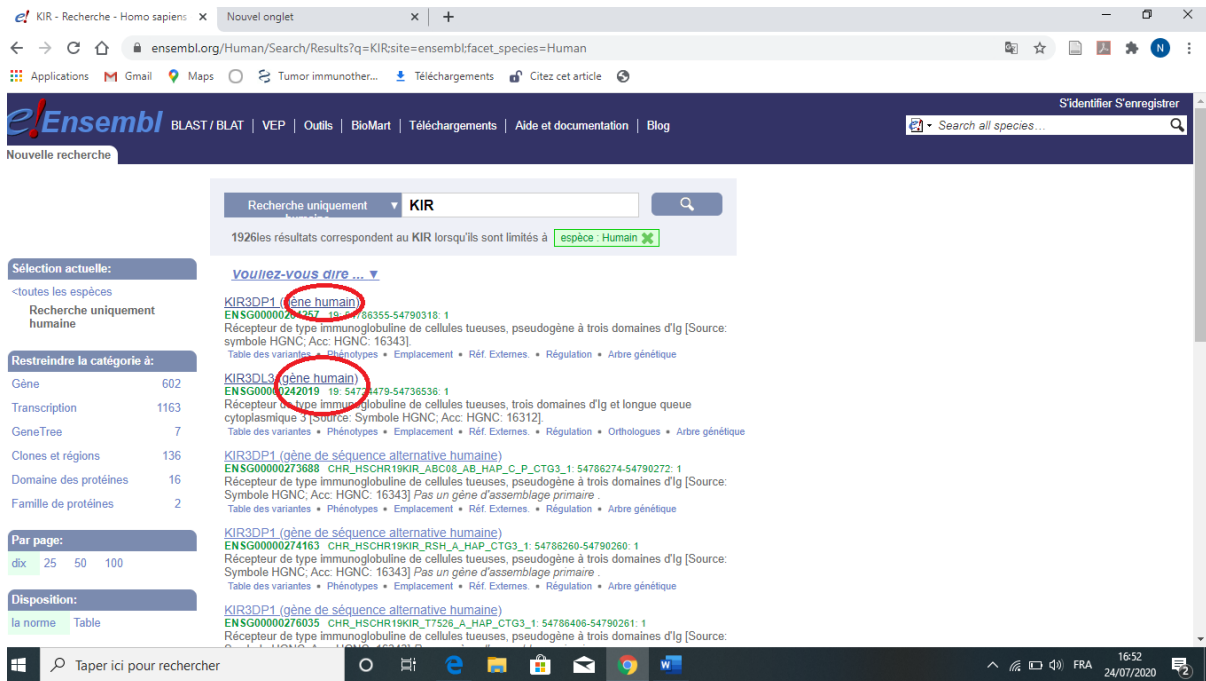


Figure 8. Le gène *KIR3DL3* à partir de site ensembl

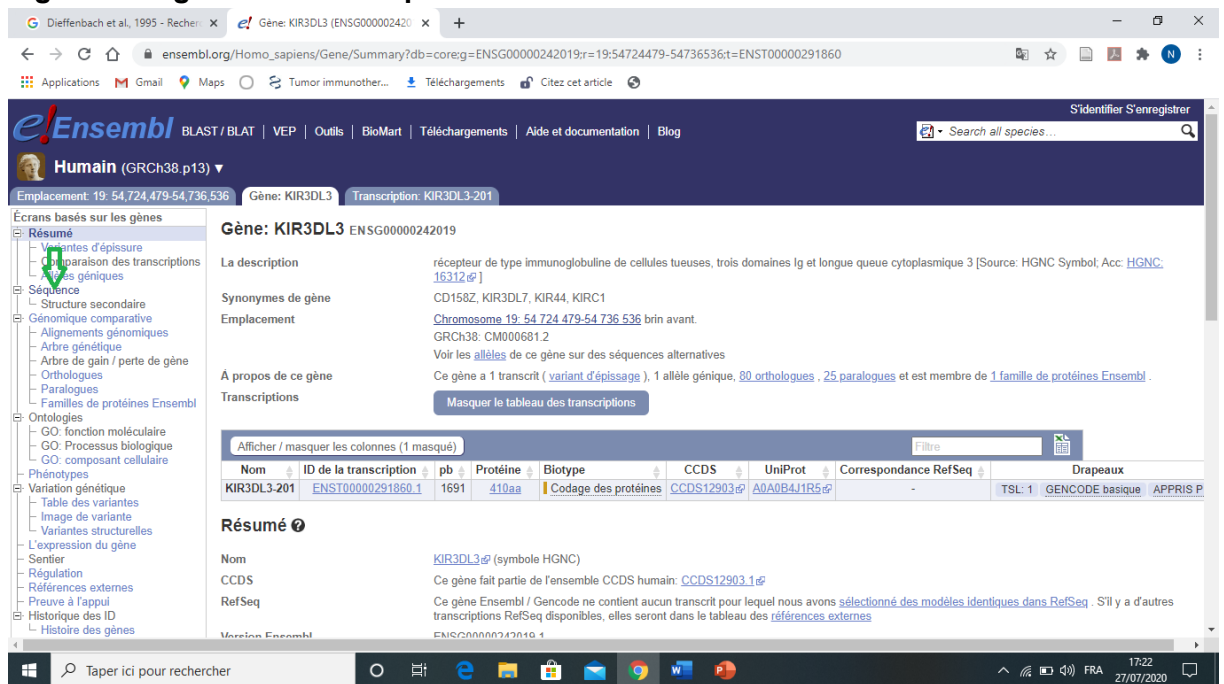


Figure 9. Description de gène *KIR3DL3*

- ❖ La séquence complète du gène est copiée dans un document Word et la séquence d'intérêt est encadrée.

2.2. La conception des amorces pour la PCR

Les amorces sont un constituant important pour l'amplification d'une séquence nucléique, le succès de cette amplification par PCR dépend d'une bonne conception des amorces, elles

Chapitre 2. Matériels et méthodes

déterminent la position spécifique et la longueur du produit ainsi que la température de fusion.

Des amorces mal conçues donneront soit des produits aspécifiques, ce qui faussera l'analyse de la séquence demandée, soit pas de produit du tout.

2.3. La sélection des amorces

Lors d'une conception d'amorce plusieurs variables doivent être prise en considération telles que :

2.3.1. La longueur de l'amorce

Ce paramètre est essentiel pour le succès de la PCR. En général l'amorce doit avoir une longueur entre 18 et 24 nucléotides à condition que la température d'hybridation soit optimale. La longueur d'amorce est proportionnelle à l'efficacité de l'hybridation.

2.3.2. La température de fusion

Elle est située entre 56°C et 62°C et les deux amorces sens et antisens doivent avoir des températures de fusion d'une différence qui ne dépasse pas les 5°C (Lorenz, 2012)

2.3.3. La spécificité

Les séquences des deux amorces sens et antisens doivent être complémentaires et spécifiques aux régions flanquantes de la séquence à amplifier.

2.3.4. Complémentarité dans les séquences d'amorces

Les amorces doivent être conçus sans homologie intra-amorce car si on aura une amorce avec une telle région d'auto-complémentarité, des structures double brin en épingle à cheveux peuvent se former ce qui provoque une perturbation d'hybridation avec l'amorce, ainsi une homologie située à l'extrémité 3' de l'une ou de l'autre provoque un arrêt de la formation du produit.

La complémentarité des séquences entre amorce sens et antisens doit aussi être évité, car cela conduira à la formation de dimères d'amorces et par la suite aucune amplification ne sera possible.

2.3.5. La teneur en G/C

La séquence des deux amorces doit contenir entre 40-60% des nucléotides G et C, car ces nucléotides renforcent l'hybridation avec la séquence d'intérêt (Lorenz, 2012).

Chapitre2. Matériels et méthodes

2.3.6. La séquence à l'extrémité 3'

La position terminale 3' dans la séquence des amorces est importante afin d'éviter le désamorçage, une inclusion d'un résidu G-C à l'extrémité 3' des amorces contribue à la fixation correcte à l'extrémité 3' grâce à la présence des liaisons hydrogènes plus forte entre les résidus G-C ce qui donnera à une grande efficacité de la PCR et empêcher la respiration et augmente la température de fusion (Lorenz, 2012).

2.4. Le design des primer

A partir des ressources du National Center For Biotechnology Information (NCBI) nous avons utilisé le logiciel Primer blast dans le site « www. ncbi. nlm. nih. Gov » pour concevoir la bonne paire d'amorces (figure10et figure11)

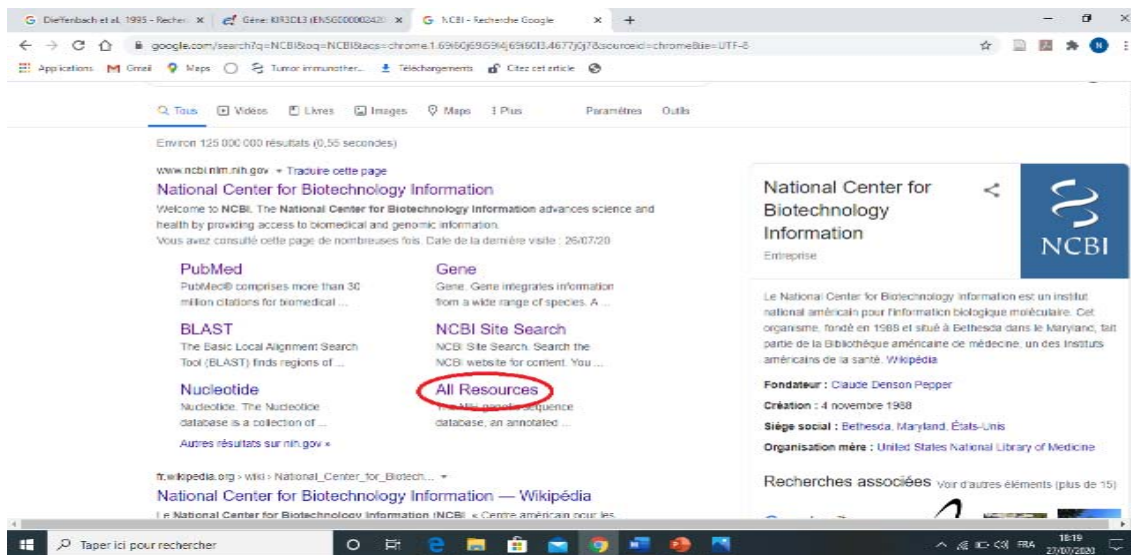


Figure10. Le site NCBI

Chapitre 2. Matériels et méthodes

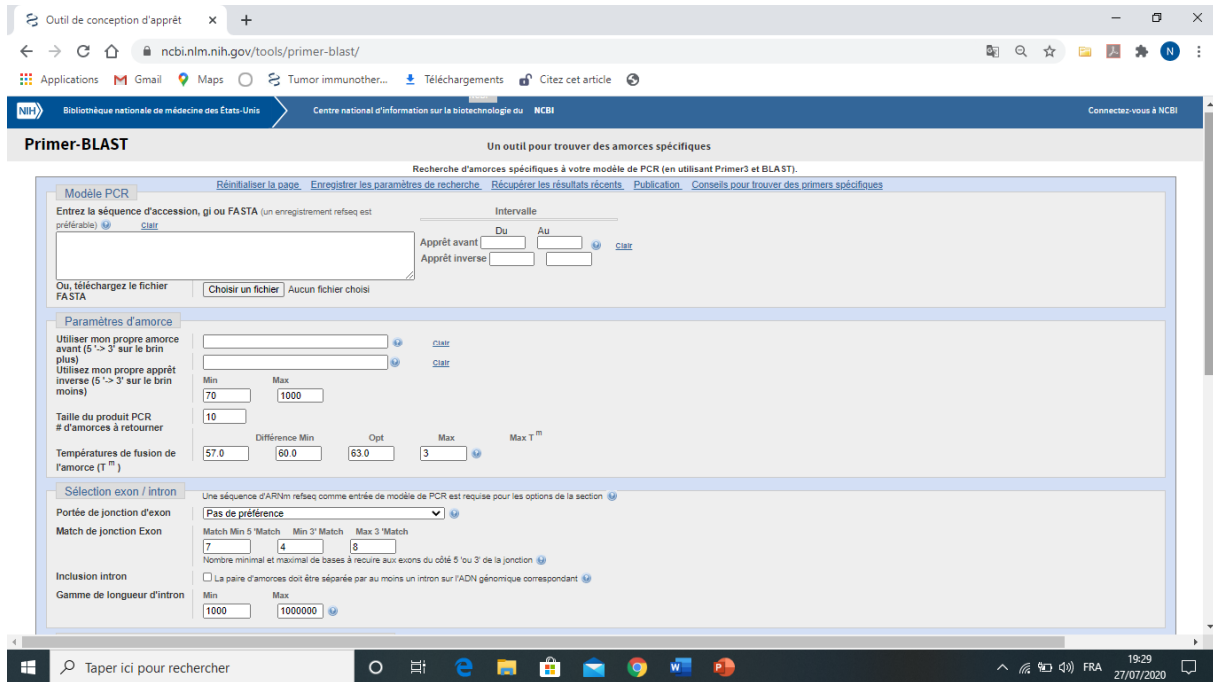


Figure 11. L'outil primer Blast

2.4.1. Définition

Primer-BLAST est un outil largement utilisé pour la conception d'amorces spécifiques pour PCR ainsi il permet d'atténuer la difficulté de concevoir des amorces spécifiques par le primer3 (Ye et al., 2012) et offre des options flexibles afin de répondre à diverses exigences de rigueur de spécificité avec l'utilisation d'une recherche BLAST (Ye et al., 2012).

2.4.2. Les étapes du primer Blast

Les étapes ci-dessous représentent les étapes de l'utilisation du Primer-BLAST :

- ✓ Dans une première étape on copie la séquence d'intérêt dans le primer blast et il faut éliminer les espaces entre les bases (figure 12)

Chapitre2. Matériels et méthodes

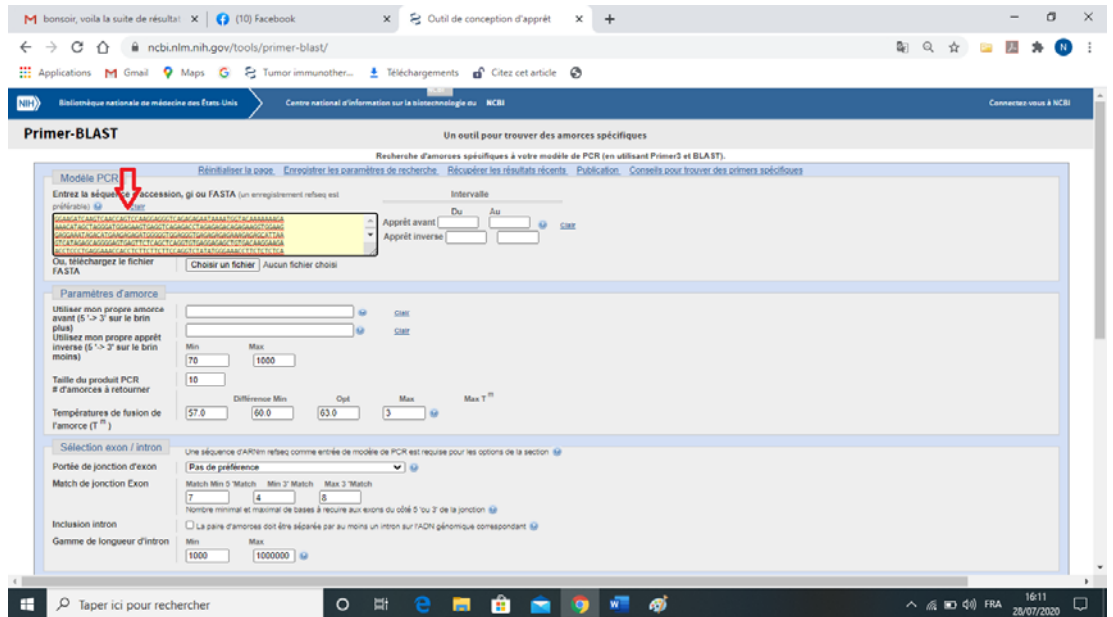


Figure12. La séquence d'intérêt dans le site Primer Blast

- ✓ Par la suite, l'intervalle de la séquence où on veut avoir l'amorce sens et l'amorce antisens est précisé au logiciel.
- ✓ Terminer la procédure en cliquant sur Get Primer (figure 13)

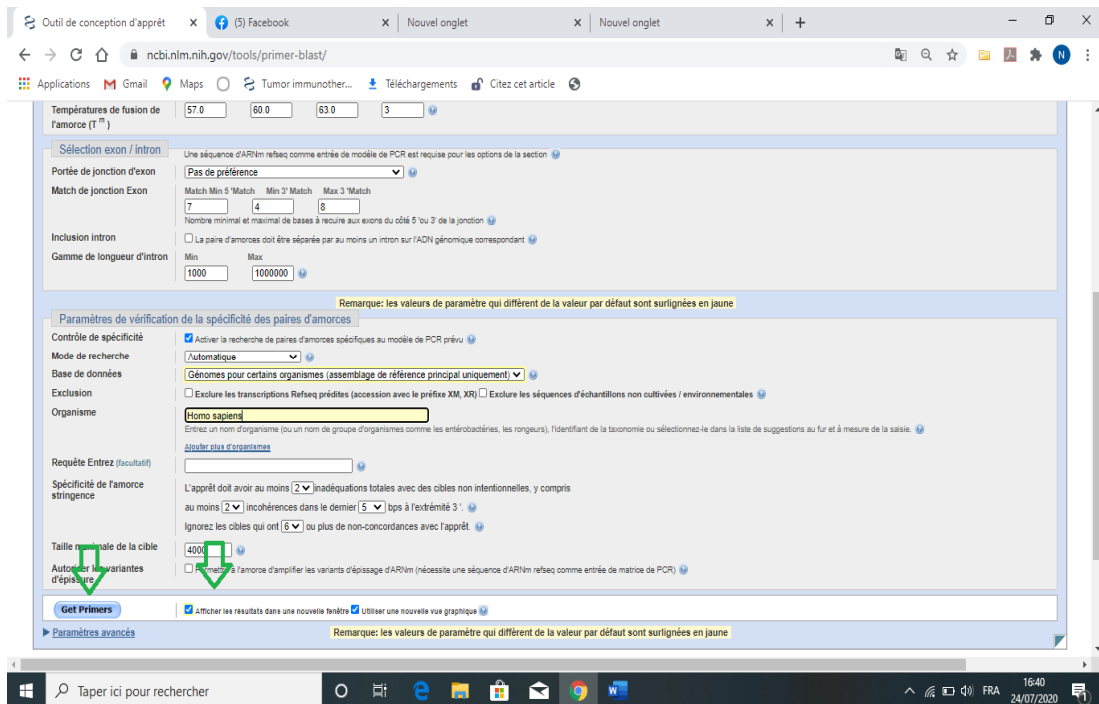


Figure13. Paramètres de vérification de la spécificité des paires d'amorces

Chapitre3.Résultats

3.1. Résultat de la recherche de la séquence du gène *KIR3DL3*

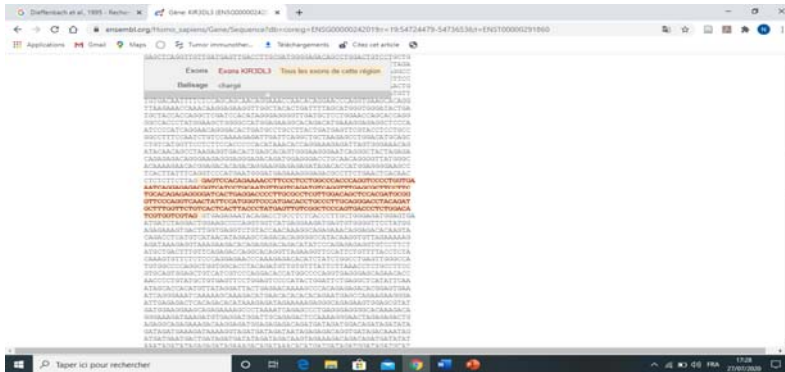


Figure14. La séquence de gène *KIR3DL3*

3.2. Résultats de la conception d'amorce

- ✓ A l'aide du logiciel Primer Blast nous avons obtenu dix paires d'amorces avec une seule bonne paire d'amorces car les 9 paires d'amorces peuvent amplifier des produits aspécifiques de taille inférieure à 1000pb (figure)

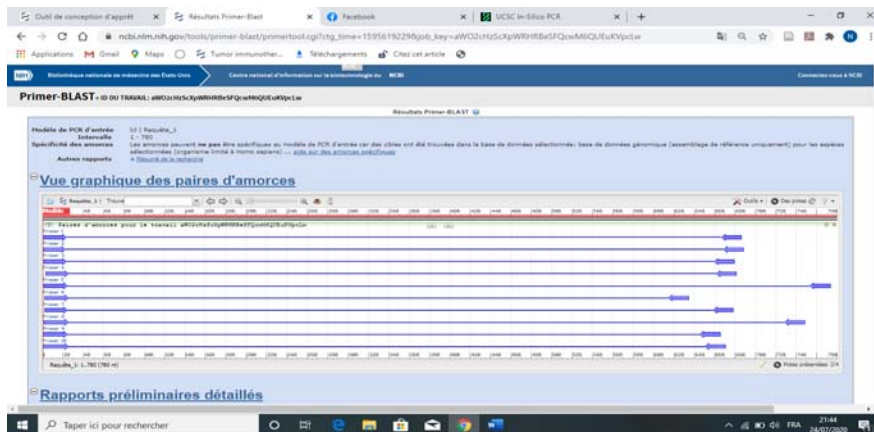


Figure15. Les dix paires d'amorces

- ✓ La paire d'amorce choisie donnera un produit spécifique de taille égale à 676pb (figure25)
- ✓ Les hybridations aspécifiques sont au niveau de séquences de taille supérieur à 1000pb (figure25)
- ✓ La température d'hybridation est 59°C et une température de 55°C- 72°C donne un bon résultat (figure25)
- ✓ La longueur des amorces est de 20 bases, les oligonucléotides qui ont une longueur entre 18-24 paires de bases sont extrêmement spécifiques si la température d'hybridation est optimale (figure25)

Chapitre3. Résultats

- ✓ La teneur en GC% est 50%, alors qu'elle doit être comprise entre 40% et 60% (figure25)

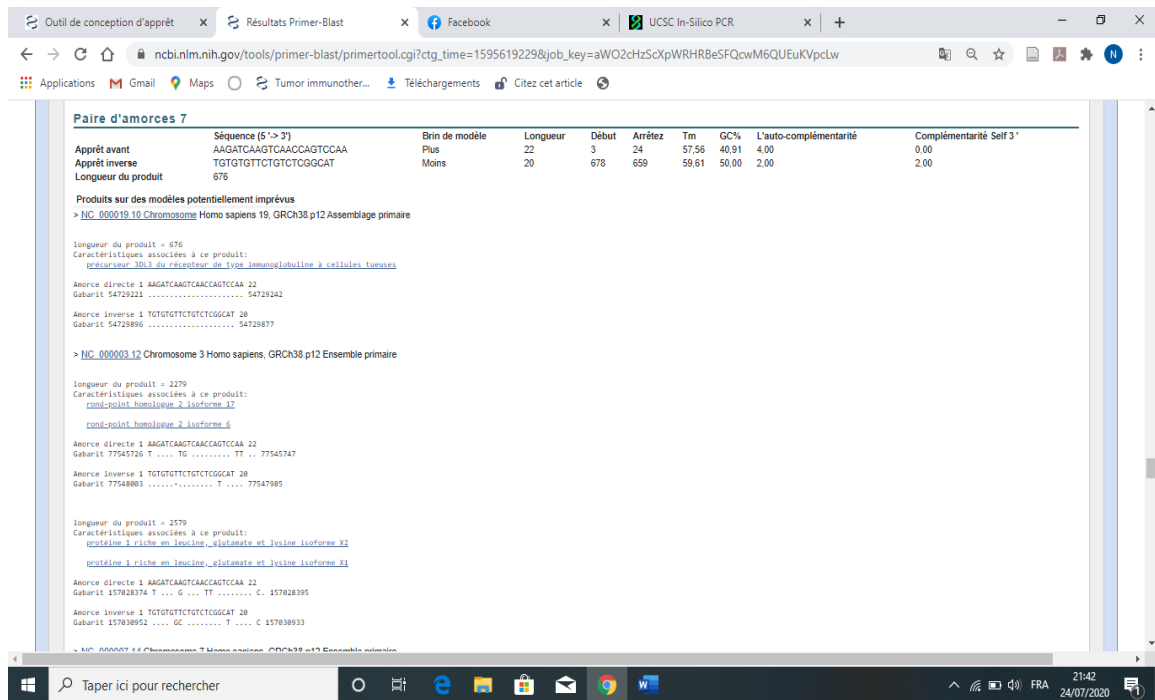


Figure16. Résultats du primer Blast

3.3. Confirmation des résultats

Dans le but de confirmer les résultats du Primer Blast nous avons soumis la bonne paire d'amorce à une analyse de confirmation par le site <https://genome.ucsc.edu/t> avec l'application in silico PCR.

Les séquences des amorces forward et réverse sont copiées dans les cases adéquates du PCR in -Silico puis pour les soumettre à analyse de comparaison dans toute la séquence du génome humain (figure27)

Chapitre3. Résultats

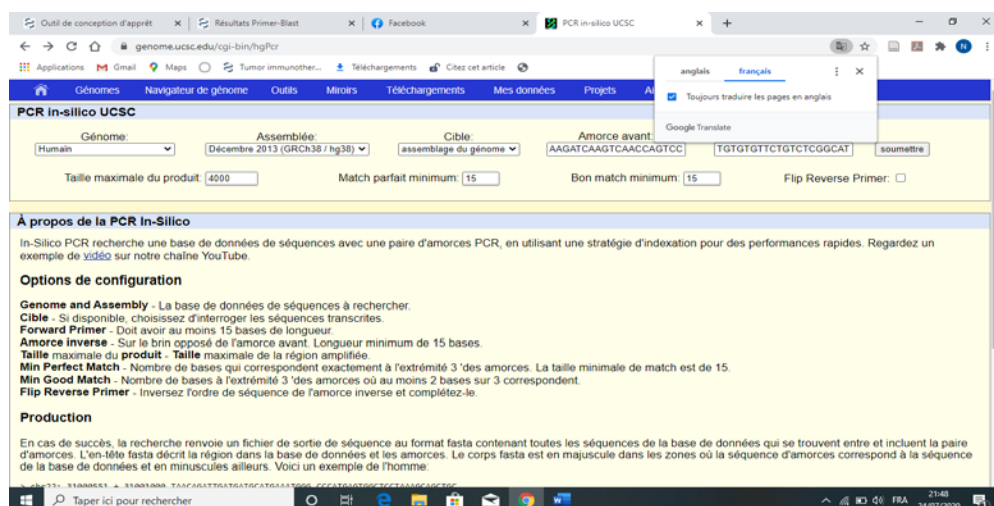


Figure17. La forward et la reverse primer dans PCR in-Silico

Les résultats de la confirmation ont donné que le produit situé sur le chromosome19 (figure28 et figure29) ce qui confirme la spécificité ainsi la fiabilité de la bonne paire d'amorce. Qui va donner, après amplification un produit de 676 Pb

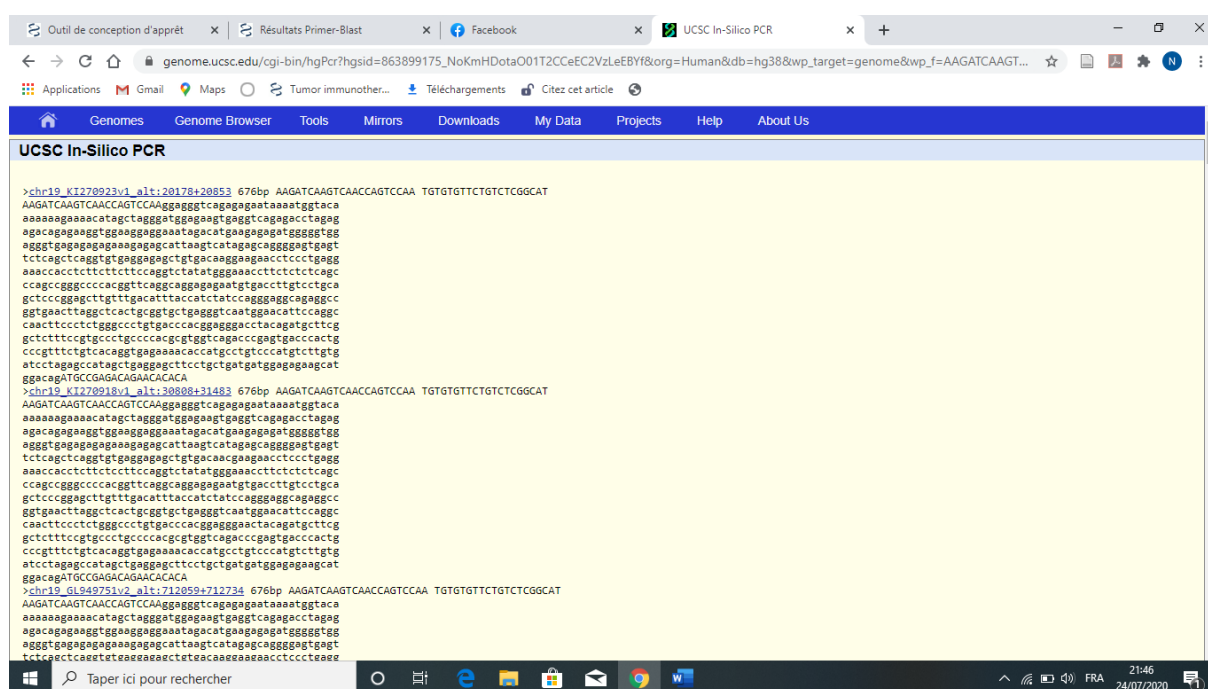


Figure18. Confirmation des Résultats par le site UCSC in silico PCR

Chapitre4. Conclusion et perspective

Chapitre4. Conclusion et perspectives

Les cellules NK présentent la première ligne de défense contre la cellule cancéreuse et fait partie des grands lymphocytes granuleux (GLG), elles se caractérisent par la présence de CD56 et elles sont capables de tuer les cellules malades sans entrer en contact avec l'agent pathogène elle permet aussi d'induire la mort de corps apoptotique grâce à des perforines et granzymes, leur différenciation passe par l'acquisition de certains récepteurs fonctionnelles tels que les récepteurs KIR.

Les récepteurs KIR sont des glycoprotéines transmembranaires se trouvent à la surface des cellules NK et ils se divisent en deux types le KIRi et KIRa où l'ensemble de leurs signaux déclenchent un état actif de la cellule NK.

Le gène *KIR* est localisé dans le récepteur leucocytaire (LRC) au niveau du chromosome 19q13.4 dans les régions 150Kb et est codé par 17 gènes et 2 pseudogènes ce qui donne un génotype qui se divise en deux haplotypes A et B et présente une grande diversité génétique.

Les récepteurs KIR jouent un rôle essentiel dans l'immunité anti tumorale orchestrée par la cellule NK ou ils protègent les cellules normales et attaquent les cellules tumorales grâce à des signaux que partagent les deux types de KIR où chaque type a un mode d'action spécifique.

Il est intéressant d'analyser les altérations au niveau des séquences du gène *KIR* et leur niveau d'expression dans le cancer et faire une comparaison avec des témoins sains, pour cela ces séquences doivent être amplifiés par la technique PCR.

Le travail effectué, au cours de ce mémoire, nous a permis de retrouver tout d'abord la séquence de tous les gènes codant KIR et de concevoir des amorces spécifiques de ce gène. Ces amorces serviront à obtenir de bons produits d'amplification par PCR.

Les résultats trouvés montrent une bonne paire d'amorces pour amplifier l'exon 5 du gène *KIR* dont nous avons confirmé leurs spécificités ainsi que leur fiabilité par PCR in-Silico, qui donnent un produit d'amplification d'une taille de 676 Pb Afin d'analyser l'expression du gène *KIR* en association avec l'immunité anti tumorale.

En perspective, ces amorces serviront, dans des études avenir à étudier l'expression du gène *KIR* dans le cancer par analyse des produits de PCR ainsi qu'une analyse de séquence par séquençage.

Références et bibliographie

- Augusto, D.G. (2016). The Impact of KIR Polymorphism on the Risk of Developing Cancer: Not as Strong as Imagined? *Front Genet* 7, 121.
- Augusto, D.G., Piovezan, B.Z., Tsuneto, L.T., Callegari-Jacques, S.M., and Petzl-Erler, M.L. (2013). KIR gene content in amerindians indicates influence of demographic factors. *PLoS ONE* 8, e56755.
- Babor, F., Fischer, J.C., and Uhrberg, M. (2013). The role of KIR genes and ligands in leukemia surveillance. *Front Immunol* 4, 27.
- Baumeister, S.H.C., Rambaldi, B., Shapiro, R.M., and Romee, R. (2020). Key Aspects of the Immunobiology of Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation. *Front Immunol* 11, 191.
- Bi, J., and Tian, Z. (2019). NK Cell Dysfunction and Checkpoint Immunotherapy. *Front Immunol* 10, 1999.
- Bozzano, F., Marras, F., and De Maria, A. (2017). Natural Killer Cell Development and Maturation Revisited: Possible Implications of a Novel Distinct Lin-CD34+DNAM-1brightCXCR4+ Cell Progenitor. *Front Immunol* 8, 268.
- Campbell, K.S., and Purdy, A.K. (2011). Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. *Immunology* 132, 315–325.
- Carlsten, M., and Järås, M. (2019). Natural Killer Cells in Myeloid Malignancies: Immune Surveillance, NK Cell Dysfunction, and Pharmacological Opportunities to Bolster the Endogenous NK Cells. *Front Immunol* 10, 2357.
- Cichocki, F., Grzywacz, B., and Miller, J.S. (2019). Human NK Cell Development: One Road or Many? *Front. Immunol.* 10, 2078.
- Cook, K.W., Durrant, L.G., and Brentville, V.A. (2018). Current Strategies to Enhance Anti-Tumour Immunity. *Biomedicines* 6.
- Cooley, S., Parham, P., and Miller, J.S. (2018). Strategies to activate NK cells to prevent relapse and induce remission following hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 131, 1053–1062.
- Cooper, G.M. (2000). *The cell: a molecular approach* (Washington, DC: ASM Press [u.a.]).
- Crinier, A., Narni-Mancinelli, E., Ugolini, S., and Vivier, E. (2020). SnapShot: Natural Killer Cells. *Cell* 180, 1280-1280.e1.
- Daher, M., and Rezvani, K. (2018). Next generation natural killer cells for cancer immunotherapy: the promise of genetic engineering. *Curr. Opin. Immunol.* 51, 146–153.
- Durbin, R.P. (1975). Letter: Acid secretion by gastric mucous membrane. *Am. J. Physiol.* 229, 1726.
- Fauriat, C., Long, E.O., Ljunggren, H.-G., and Bryceson, Y.T. (2010). Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* 115, 2167–2176.
- Fu, B., Tian, Z., and Wei, H. (2014). Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects. *Immunology* 141, 483–489.

Références et bibliographie

- Garibyan, L., and Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *J. Invest. Dermatol.* *133*, 1–4.
- Garner, A., and Ashton, N. (1970). Intermittent oxygen in retrolental fibroplasia. *J. Pathol.* *101*, Pxiv.
- Ghanadi, K., Shayanrad, B., Ahmadi, S.A.Y., Shahsavar, F., and Eliasy, H. (2016). Colorectal cancer and the KIR genes in the human genome: A meta-analysis. *Genom Data* *10*, 118–126.
- Ghannam, M.G., and Varacallo, M. (2020). Biochemistry, Polymerase Chain Reaction (PCR). In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Gupta, N. (2019). DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *J Cytol* *36*, 116–117.
- Hu, W., Wang, G., Huang, D., Sui, M., and Xu, Y. (2019). Cancer Immunotherapy Based on Natural Killer Cells: Current Progress and New Opportunities. *Front Immunol* *10*, 1205.
- Huth, T.K., Brenu, E.W., Staines, D.R., and Marshall-Gradisnik, S.M. (2016). Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor Genotype and Haplotype Investigation of Natural Killer Cells from an Australian Population of Chronic Fatigue Syndrome/Myalgic Encephalomyelitis Patients. *Gene Regul Syst Bio* *10*, 43–49.
- Iannello, A., Débbeche, O., Samarani, S., Sabbagh, S., Duval, M., and Ahmad, A. (2007). Le *natural killer*, fer de lance des futures immunothérapies anti-tumorales ? *Med Sci (Paris)* *23*, 502–508.
- Kalle, E., Kubista, M., and Rensing, C. (2014). Multi-template polymerase chain reaction. *Biomol Detect Quantif* *2*, 11–29.
- Kumar, S. (2018). Natural killer cell cytotoxicity and its regulation by inhibitory receptors. *Immunology* *154*, 383–393.
- Leischner, C., Burkard, M., Pfeiffer, M.M., Lauer, U.M., Busch, C., and Venturelli, S. (2016). Nutritional immunology: function of natural killer cells and their modulation by resveratrol for cancer prevention and treatment. *Nutr J* *15*, 47.
- Li, Y., and Sun, R. (2018). Tumor immunotherapy: New aspects of natural killer cells. *Chin. J. Cancer Res.* *30*, 173–196.
- Liu, S., Dhar, P., and Wu, J.D. (2019). NK Cell Plasticity in Cancer. *J Clin Med* *8*.
- Mace, E.M., and Orange, J.S. (2019). Emerging insights into human health and NK cell biology from the study of NK cell deficiencies. *Immunol. Rev.* *287*, 202–225.
- Maheaswari, R., Kshirsagar, J.T., and Lavanya, N. (2016). Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology. *J Indian Soc Periodontol* *20*, 128–135.
- Marsh, S.G.E., Parham, P., Dupont, B., Geraghty, D.E., Trowsdale, J., Middleton, D., Vilches, C., Carrington, M., Witt, C., Guethlein, L.A., et al. (2003). Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Tissue Antigens* *62*, 79–86.
- Miller, T., and Tanaka, T. (1979). Nuclear scan of pulmonary hemorrhage in idiopathic pulmonary hemosiderosis. *AJR Am J Roentgenol* *132*, 120–121.

Références et bibliographie

- Minetto, P., Guolo, F., Pesce, S., Greppi, M., Obino, V., Ferretti, E., Sivori, S., Genova, C., Lemoli, R.M., and Marcenaro, E. (2019). Harnessing NK Cells for Cancer Treatment. *Front Immunol* *10*, 2836.
- Munhoz, R.R., and Postow, M.A. (2016). Recent advances in understanding antitumor immunity. *F1000Res* *5*, 2545.
- Nagai, H., and Kim, Y.H. (2017). Cancer prevention from the perspective of global cancer burden patterns. *J Thorac Dis* *9*, 448–451.
- Olenik, C., Krüger, E., Söling, F., Hahn, W., Messerschmid, M., and Hausmann, R. (1991). T7 infection-dependent selective expression of cloned genes in P1-lysogenic *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *179*, 1200–1204.
- Paul, S., and Lal, G. (2017). The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* *8*, 1124.
- PDQ Screening and Prevention Editorial Board (2002). Cancer Prevention Overview (PDQ®): Health Professional Version. In *PDQ Cancer Information Summaries*, (Bethesda (MD): National Cancer Institute (US)), p.
- Poggi, A., Benelli, R., Venè, R., Costa, D., Ferrari, N., Tosetti, F., and Zocchi, M.R. (2019). Human Gut-Associated Natural Killer Cells in Health and Disease. *Front Immunol* *10*, 961.
- Purdy, A.K., and Campbell, K.S. (2009). Natural killer cells and cancer: regulation by the killer cell Ig-like receptors (KIR). *Cancer Biol. Ther.* *8*, 2211–2220.
- Schwartz, J.C., Sanderson, N.D., Bickhart, D.M., Smith, T.P.L., and Hammond, J.A. (2019). The Structure, Evolution, and Gene Expression Within the Caprine Leukocyte Receptor Complex. *Front Immunol* *10*, 2302.
- Sharma, G.N., Dave, R., Sanadya, J., Sharma, P., and Sharma, K.K. (2010). Various types and management of breast cancer: an overview. *J Adv Pharm Technol Res* *1*, 109–126.
- van Son, W.J., van der Woude, F.J., van der Jagt, E.J., Donker, A.J., Meijer, S., Slooff, M.J., The, T.H., Tegzess, A.M., and van der Slikke, L.B. (1985). Pneumatosis intestinalis in patients after cadaveric kidney transplantation: possible relationship with an active cytomegalovirus infection. *Proc Eur Dial Transplant Assoc Eur Ren Assoc* *21*, 936–940.
- Stoscheck, C.M., and King, L.E. (1986). Functional and structural characteristics of EGF and its receptor and their relationship to transforming proteins. *J. Cell. Biochem.* *31*, 135–152.
- Sugioka, D.K., Gonçalves, C.E.I., and Bicalho, M. da G. (2016). KIR repertory in patients with hematopoietic diseases and healthy family members. *BMC Hematol* *16*, 25.
- Valones, M.A.A., Guimarães, R.L., Brandão, L.A.C., de Souza, P.R.E., de Albuquerque Tavares Carvalho, A., and Crovela, S. (2009). Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Braz. J. Microbiol.* *40*, 1–11.
- Vargas, C.L., Poursine-Laurent, J., Yang, L., and Yokoyama, W.M. (2011). Development of thymic NK cells from double negative 1 thymocyte precursors. *Blood* *118*, 3570–3578.
- Vermaelen, K. (2019). Vaccine Strategies to Improve Anti-cancer Cellular Immune Responses. *Front Immunol* *10*, 8.

Références et bibliographie

Wagner, I., Schefzyk, D., Pruschke, J., Schöfl, G., Schöne, B., Gruber, N., Lang, K., Hofmann, J., Gnahn, C., Heyn, B., et al. (2018). Allele-Level KIR Genotyping of More Than a Million Samples: Workflow, Algorithm, and Observations. *Front Immunol* 9, 2843.

Résumé

Introduction. Les cellules naturelles tueuses (NK) font partie des grands lymphocytes granuleux (GLG) et présentent la première ligne de défense contre les cellules transformées par la présence de différents récepteurs fonctionnelles comme les récepteurs de types immunoglobulines tueuses (KIR) sont des glycoprotéines. La polymérase chaîne réaction (PCR) est une technique enzymatique qui permet d'analyser et détecter les altérations des niveaux d'expression des gènes dans le cancer grâce à de bonnes paires d'amorces.

Objectif. Concevoir des amorces spécifiques au gène *KIR*, exprimé sur la cellule NK dans le cancer, en utilisant le logiciel Primer-BLAST.

Matériel et méthode. Nous avons lancé une étude bio-informatique afin de trouver la séquence génomique du gène *KIR* dans la base de données www.ensembl.org. A partir du National Center For Biotechnology Information (NCBI) nous avons utilisé le logiciel Primer-BLAST pour concevoir la bonne paire d'amorce du gène *KIR* et dans le but de confirmer leur spécificité ainsi que leur fiabilité, pour l'utilisation dans la technique PCR, nous avons soumis la paire d'amorces choisie à une confirmation de résultats par la PCR in -Silico.

Résultats. Dans les résultats donnés par le Primer-BLAST la paire d'amorce numéro 7 est celle qui présente les bonnes caractéristiques d'une paire d'amorce. Elle donnerait un produit d'amplification spécifique de 676pb qui correspond à l'exon5 Du gène *KIR*. Et donnerait des produits aspécifiques de taille supérieur à 1000pb, ce qui rend leur amplification impossible. Cette paire à une longueur de 20 bases et une température d'hybridation de 59°C ainsi qu'une teneur en GC de 50%.

Conclusion. La paire d'amorce choisie est spécifique et fiable pour faire une amplification de l'exon 5 du gène *KIR* par la technique PCR qui permet d'étudier l'expression du gène *KIR* et d'analyser les modifications de sa séquence, dans le cancer.

Mots clés

La cellule NK, gène *KIR*, Amorce, cancer, PCR.

Background. Natural killer cells (NK) are part of the large granular lymphocytes (GLG) and present the first line of defense against cells transformed by the presence of different functional receptors as killer immunoglobulin-like receptors (KIRs) are glycoproteins. Polymerase chain reaction (PCR) is an enzymatic technique which allows the analysis and detection of alterations in the levels of gene expression in cancer thanks to good pairs of primers

Objective. Design primers specific to the KIR gene, expressed on the NK cell in cancer, using the Primer-BLAST software.

Material and method. We launched a bioinformatics study to find the genomic sequence of the KIR gene in the database www.ensembl.org. From the National Center For Biotechnology Information (NCBI) we used Primer-BLAST software to design the correct primer pair for the KIR gene, and in order to confirm their specificity as well as their reliability, for use in the PCR technique, we submitted the chosen primer pair for confirmation by in -Silico PCR.

Results. In the results given by the Primer-BLAST, primer pair number 7 is the one that has the right characteristics of a primer pair. It would give a specific amplification product of 676bp which corresponds to exon5 of the KIR gene. And would give non-specific products larger than 1000bp, which makes their amplification impossible. This pair is 20 bases long and has a hybridization temperature of 59 ° C and a GC content of 50%.

Conclusion. The primer pair chosen is specific and reliable for amplifying exon 5 of the KIR gene by the PCR technique which makes it possible to study the expression of the KIR gene and to analyze changes in its sequence in cancer.

Keywords

The NK cell, KIR gene, Primer, cancer, PCR.

المقدمة. تعد الخلايا القاتلة الطبيعية (NK) جزءاً من الخلايا الليمفاوية الحبيبية الكبيرة (GLG) وتقدم خط الدفاع الأول ضد الخلايا المتحولة من خلال وجود مستقبلات وظيفية مختلفة مثل مستقبلات شبيهة بالجلوبولين المناعي (KIRs) هي بروتينات سكرية. سلسلة البوليميراز التفاعلي (PCR) هي تقنية أنزيمية مما تسمح بتحليل واكتشاف التغيرات في مستويات التعبير الجيني في السرطان بفضل أزواج جيدة من البادئات.

الهدف. تصميم البادئات الخاصة بالجين KIR, الذي يوجد على سطح الخلية NK باستخدام برنامج Primer-BLAST

المواد والطرق. أطلقنا دراسة المعلوماتية الحيوية من أجل إيجاد التسلسل الجيني لجين KIR في قاعدة البيانات www.Ensembl.org. من المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI) استخدمنا برنامج Primer-BLAST لتصميم الزوج الصحيح من البادئات لجين KIR ومن أجل تأكيد خصوصيتها وموثوقيتها، لاستخدامها في تقنية PCR أخضعنا زوج البادئات المختار لتأكيد النتائج بواسطة PCR-Silico.

النتائج. في النتائج التي قدمتها Primer-BLAST، فإن زوج البادئات رقم 7 هو الذي يحتوي على الخصائص الجيدة بالنسبة لزوج البادئات. سيعطي ناتج تضخيم محدد من 676pb والذي يتوافق مع exon5 من الجين KIR. وسيعطي منتجات غير محددة أكبر من 1000pb مما يجعل تضخيمها مستحيلاً. يبلغ طول هذا الزوج 20 قاعدة ودرجة حرارة التهجين 59 درجة مئوية وكذلك محتوى GC بنسبة 50%.

الاستنتاج زوج البادئات الذي تم اختياره محدد وموثوق به لتضخيم exon 5 من الجين KIR بواسطة تقنية PCR مما يجعل من الممكن دراسة التعبير عن الجين KIR وتحليل التغيرات في تسلسلها في السرطان.

الكلمات المفتاحية. الخلية القاتلة الطبيعية، جين KIR، البادئات، السرطان، PCR.