



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



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

Département de Biologie

Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et d'Immunologie W 041 41 00

MEMOIRE

Présenté par

BENYAHIA Fatima Zohra

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

Spécialité Immunologie

Thème :

Conception d'amorces pour le gène *CTLA-4*
associé à l'auto-immunité

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

Président	Dr. ELMEZOUAR Chahrazed	MAA	Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen
Encadreur	Dr. BRAHAMI Nabila	MCA	Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen
Examinatrice	Dr. NOUARI Wafa	MCB	Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen

Année universitaire 2019/2020



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



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

Département de Biologie

Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et d'Immunologie **W 041 41 00**

MEMOIRE

Présenté par

BENYAHIA Fatima Zohra

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

Spécialité Immunologie

Thème :

Conception d'amorces pour le gène *CTLA-4*
associé à l'auto-immunité

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

Président	Dr. ELMEZOUAR Chahrazed	MAA	Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen
Encadreur	Dr. BRAHAMI Nabila	MCA	Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen
Examinatrice	Dr. NOUARI Wafa	MCB	Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen

Année universitaire 2019/2020

Résumé

Introduction : l'auto-immunité chez l'homme est le résultat d'un échec de contrôle des cellules autoréactives qui se produit à cause de nombreux acteurs parmi lesquels le CTLA-4. Cette molécule atténue la costimulation des LT en se liant en compétition avec le B7 sur le CD28.

De nombreuses études ont montré l'association d'un polymorphisme du gène *CTLA-4* à une grande variété de maladies auto-immunes. Ces études sont principalement réalisées par des analyses PCR. Lors de la mise en point de ces analyses le choix des amorces constitue une étape cruciale.

Objectif : Concevoir avec spécificité un couple d'amorces encadrant le SNP de l'exon 1 du gène *CTLA-4* afin d'initier par la suite l'analyse de la séquence de ce gène par PCR.

But : Utiliser les amorces conçues pour la réalisation de futures recherches sur l'association du SNP du gène CTLA-4 aux maladies auto-immunes par une comparaison des génotypes des cas et des témoins.

Matériels et méthodes : Nous avons mené une étude bio-informatique consistant à la recherche de la séquence génomique du gène *CTLA-4* par l'utilisation de la base de données Ensembl, puis nous avons utilisé le logiciel Primer blast pour concevoir des amorces spécifiques encadrant l'exon 1 du gène *CTLA-4* et analyser, ensuite, les résultats de cette conception des amorces afin de sélectionner la paire la plus spécifiques.

Résultats : Après l'obtention de la séquence complète du gène *CTLA-4* contenant les exons et les introns et l'utilisation du logiciel Primer-BLAST pour concevoir les amorces spécifiques, la paire d'amorces adéquate est sélectionnées et qui répond à une température d'hybridation de 60°C. la longueur de l'amorce sens est de 19 nucléotides et l'amorce antisens de 20 nucléotides. La teneur en GC de l'amorce sens est de 57% et de l'amorce antisens est de 55%. Le produit qui sera amplifié à une longueur de 508 paires de bases et les autres produits, aspécifiques ; où s'hybrident ces amorces, ont tous une longueur supérieure à 1000pb (ce qui est une taille impossible à amplifier par PCR).

Conclusion : Nous avons élaboré grâce à ce travail, un couple d'amorce qui encadre le polymorphisme SNP de l'exon 1 du gène *CTLA-4* associé aux maladies auto-immunitaires qui est considéré comme préfigurant dans plusieurs maladies graves.

Mots clés : l'auto-immunité, CTLA-4, LT, polymorphisme, amorces, PCR.

Abstract

Introduction: Autoimmunity in humans is the result of a failure to control autoreactive cells that occurs due to many players including CTLA-4. This molecule attenuates the costimulation of LT by binding in competition with B7 on CD28.

Numerous studies have shown the association of a CTLA-4 gene polymorphism with a wide variety of autoimmune diseases. These studies are mainly carried out by PCR analyzes. During the development of these analyzes, the choice of primers constitutes a crucial step.

Objective : Design with specificity a pair of primers surrounding the SNP of exon 1 of the CTLA-4 gene in order to subsequently initiate the analysis of the sequence of this gene by PCR.

Goal : To use the primers designed for future research on the association of the CTLA-4 gene SNP with autoimmune diseases by comparing genotypes of cases and controls.

Materials and methods : We carried out a bioinformatics study consisting in the search for the genomic sequence of the CTLA-4 gene by the use of the Ensembl database, then we used the Primer blast software to design specific primers surrounding the exon 1 of the CTLA-4 gene and then analyze the results of this design of the primers in order to select the most specific pair.

Results : After obtaining the complete sequence of the CTLA-4 gene containing the exons and introns and using the Primer-BLAST software to design the specific primers, the appropriate pair of primers is selected and which responds to a temperature of 60 ° C hybridization. The length of the forward primer is 19 nucleotides and the reverse primer is 20 nucleotides. The GC content of the sense primer is 57% and the reverse primer is 55%. The product which will be amplified to a length of 508 base pairs and the other non-specific products ; where these primers hybridize, are all greater than 1000bp in length (which is a size impossible to amplify by PCR).

Conclusion : Thanks to this work, we have developed a primer pair that frames the SNP polymorphism of exon 1 of the CTLA-4 gene associated with autoimmune diseases which is considered to be a forerunner in several serious diseases.

Keywords : Autoimmunity, CTLA-4, LT, polymorphism, primers, PCR.

ملخص

مقدمة: المناعة الذاتية لدى البشر هي نتيجة الفشل في التحكم في الخلايا المناعية المضادة للذات والتي تنجم عن اختلال العديد من الجزيئات الفعالة بما في ذلك CTLA-4. يخفف هذا الجزيء من تنشيط الخلايا التائية LT من خلال الارتباط في منافسة مع B7 على CD 28.

أظهرت العديد من الدراسات ارتباط المورثة CTLA-4 مع مجموعة متنوعة من أمراض المناعة الذاتية. يتم إجراء هذه الدراسات بشكل رئيسي عن طريق تحليلات تفاعل البلمرة المتسلسل PCR. أثناء تطوير هذه التحليلات، يشكل اختيار البوادي خطوة حاسمة في التحليل.

الهدف: تصميم زوج من البوادي المحيطة بSNP ل exon 1 من جين CTLA-4 بخصوصية من أجل الشروع لاحقاً في تحليل تسلسل هذا الجين بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR .

الغرض: استخدام البوادي المصممة للأبحاث حول ارتباط SNP جين CTLA-4 بأمراض المناعة الذاتية من خلال مقارنة الأنماط الجينية للحالات.

المواد والطرق : أجرينا دراسة عن طريق المعلوماتية الحيوية والتي اشتملت على البحث عن التسلسل الجيني لجين CTLA-4 باستخدام قاعدة بياناتEnsembl ثم استخدمنا برنامج، Primer blast لتصميم بادئات محددة تحيط ب exon 1 لجين CTLA-4. ثم تحليل نتائج هذا التصميم للبوادي من أجل تحديد الزوج الأكثر تناسبا.

النتائج : بعد الحصول على التسلسل الكامل للجين CTLA-4 الذي يحتوي على exons و introns واستخدام برنامج-Primer BLAST لتصميم البوادي المحددة، يتم اختيار الزوج المناسب من البوادي والذي يستجيب لدرجة حرارة تهجين تبلغ 60 درجة مئوية طول التمهيدى الأمامي هو 19 نيوكليوتيد و العكسي 20 نيوكليوتيد. محتوى GC لقاعدة البادئ التمهيدى هو 57 ٪ والبادئ العكسي 55 ٪. المنتج الاول سيتم تضخيمه إلى طول 508 أزواج أساسية اما بالنسبة الى المنتجات الأخرى المستبعدة؛ حيث يتم تهجين هذه المواد الأولية، تكون جميعها أكبر من 1000 نقطة أساس (وهو حجم من المستحيل تضخيمه بواسطة PCR).

الخلاصة: بفضل هذا العمل، قمنا بتطوير زوج بوادي يُوَظَر تعدد الأشكال SNP ل exon 1 من جين CTLA-4 المرتبط بأمراض المناعة الذاتية التي تعتبر رائدة في العديد من الأمراض الخطيرة.

الكلمات المفتاحية: المناعة الذاتية، CTLA-4، LT، تعدد الأشكال، البوادي، تفاعل البلمرة المتسلسل، PCR،

Avant-propos

Avant tout, je remercie ALLAH le tout-puissant de m'avoir donné le courage, la volonté, la patience et la santé durant toutes ces années d'études. C'est grâce à lui que ce travail a pu être réalisé.

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie (BIOMOLIM), Université de Tlemcen, sous la direction du **Professeur Mourad ARIBI**.

Le présent mémoire est le fruit d'un long travail, d'un investissement personnel continu et d'une expérience acquise tout au long de notre formation. Il s'agit d'un travail exceptionnel qui s'est déroulé dans des conditions difficiles, liées à la crise sanitaire actuelle (la pandémie de CORONA VIRUS) et notamment dans l'absence d'un véritable aide de la part des encadreurs, qui pourrait assouplir les conditions de réalisation du mémoire. Indépendamment de tous les obstacles, c'est avec fierté et satisfaction que je vous présente mon travail.

En premier lieu je tiens à témoigner mes sincères remerciements à **Dr. Nabila BRAHAMI** mon encadreur, de m'avoir fait l'honneur de diriger ce travail de mémoire, la liberté d'action qu'elle m'a l'aisée tout le long de ce projet, ses conseils et son bon sens de gouvernance afin que nous réalisions ce projet.

Je tiens à remercier sincèrement les membres du jury qui me font le grand honneur d'évaluer ce travail.

Mes grands remerciements s'adressent également à **Mme NOUARI Wafa** pour sa disponibilité, sa gentillesse et ses précieuses directives tout au long de la réalisation de ce travail.

J'exprime ma sincère reconnaissance particulièrement à Mme **MESSAOUD Aida**, pour son soutien, sa clairvoyance, ses compétences et ses aides inestimables. Ainsi que toute l'équipe de formation d'immunologie et les membres du laboratoire pour leurs aides durant les deux ans d'étude en master.

Je ne saurai terminer sans remercier l'ensemble des enseignants à qui revient le mérite de notre formation et à tous ceux et celles, qui sont dans l'ombre et qui ont permis par leurs conseils et leurs compétences la réalisation de ce mémoire.

Je dédie mon travail à mes très chers parents, à ma mère qui m'a encouragé à aller de l'avant et mon père je n'oublie jamais leur amour leur sacrifice leur patience envers moi. Jamais je ne peux les remercier assez de m'avoir donné le meilleur d'eux. Même que Dieu les protège, à mes chères copines Hanane et Noor el Houda à mon fiancé Sofiane, à tous les membres de ma famille, ainsi que mes amis pour leurs présences et leurs soutien moral infatigable, que notre amitié dure toujours sans oublier toutes les personnes que j'estime.

Merci infiniment !!!

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
ملخص	v
Avant-propos	vi
Table des matières	vii
Liste des figures	viii
Listes des tableaux	ix
Listes des abréviations	x
Introduction	1
Chapitre 1. Revue de littérature	2
1.1. Les maladies auto-immunes	2
1.1.1. Le tissu cible du processus auto-immun.....	2
1.1.2. Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA).....	3
1.1.3. Les cellules Th.....	3
1.2. antigène associé aux lymphocytes T cytotoxiques 4(CTLA-4)	3
1.2.1. Généralité	3
1. 2.2. Expression de CTLA-4	4
1. 2.3. Signalisation CTLA-4 / CD28	5
1.2.4. Fonction de CTLA-4.....	6
1. 2.5. Gène <i>CTLA-4</i>	7
1.2.6. Structure de CTLA-4 et mutations	7
1.2.6.1. Structure	7
1.2.6.2. Mutations	8
1.2.7. CTLA-4 et auto-immunité	9
1. 2.7.1. Polymorphisme de gène CTLA-4	9
1.3. Réaction de polymérisation en chaine PCR	10
1. 3.1. Définition	10
1.3.2. Principe	10
1. 3.3. Etapes	10
1. 3.4. Choix d'amorce	11
1. 3.4.1. Définition	11
1. 3.4.2. Choix d'amorce	12
1. 3.4.2.1. La spécificité	12

1.3.4.2.2. Outils	12
1.3.4.2.3. Chercher les bonnes amorces	12
1.3.5. Problématique	12
1.3.6. Objectif	13
1.3.7. But	13
Chapitre 2. Matériels et méthodes	14
2.1. Conception des amorces pour la PCR	14
2.1.1. La longueur de l'amorce.....	14
2.1.2. La température de fusion (T _m)	14
2.1.3. La spécificité.....	14
2.1.4. Les séquences d'amorces complémentaires	14
2.1.5. La teneur en G/C et suites poly pyrimidine (T, C) ou poly purine (A, G)	15
2.1.6. La séquence à l'extrémité 3'	15
2. 2. Recherche de la séquence génomique de référence du gène <i>CTLA-4</i>.....	15
2.3. Conception des amorces par l'outil primer-BLAST.....	16
Chapitre 3. Résultats	18
3.1. Résultat de la recherche de la séquence sur ensembl	18
3.2. Résultats de la conception des amorces.....	18
3.3. Confirmations des résultats	20
Chapitre 4. Conclusion générale	22
Chapitre 5. Bibliographie	23

Liste des Figures

- Figure 1. Mécanismes cellulaires qui pourraient contribuer à une maladie auto-immune.
- Figure 2. Une cellule présentatrice d'antigène (APC) interagissant avec une cellule T. montrant le rôle des molécules d'auto-immunité clés.
- Figure3. Conséquences des interaction B7/CTLA-4 sur les LT.
- Figure4. Inhibition médiée par CTLA-4 des lymphocytes T.
- Figure5. Principaux mécanismes de régulation de l'activation du lymphocyte T dépendante d'un signal TCR.
- Figure6. Localisation du gène *CTLA-4* sur le chromosome 2 humain.
- Figure7. Représentation de structure de CTLA-4.
- Figure 8. La Structure et les mutations du CTLA- 4.
- Figure 9. Principe de la réaction de polymérisation en chaîne PCR.
- Figure 10. Recherche de la séquence du gène *CTLA-4* sur la base de données Ensembl.
- Figure 11. L'outils Primer BLAST.
- Figure 12. La dernière étape dans Primer BLAST.
- Figure 13. Résultat de la recherche de la séquence CTLA-4 sur Ensembl.
- Figure 14. Les résultats de la conception d'amorces par Primer-BLAST.
- Figure 15. La bonne paire d'amorce.
- Figure 16. Confirmation des résultats par in silico PC.

Liste des Tableaux

Tableau 1. Polymorphismes du gène CTLA-4 et diverses maladies auto-immunes.

Liste des Abréviations

A

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AP-1 : Protéine activatrice 1.

C

CD : Cluster de différenciation.

CMH : Complexe Major d'Histocompatibilité.

CPA : Cellules présentatrices d'antigènes.

CSK : C-terminal Src Kinase.

CTLA-4 : Antigène associé aux lymphocytes T cytotoxiques 4.

D

dNTP : Désoxyribonucléosides triphosphates.

H

HLA : Antigène leucocytaire humain.

I

Ig : Immunoglobine.

Il : Interleukine.

IL-4 : Interleukine-4.

IL-5 : Interleukine 5.

IL-10 : Interleukine 10.

L

LB : Lymphocyte B.

Lck : Protéine tyrosine kinase spécifique des lymphocytes.

LT : Lymphocyte T.

LTCD4+ : Lymphocyte T CD4+.

LTCD8+ : Lymphocyte T CD8+.

LTeff : Lymphocyte T effectrice.

LTh : Lymphocyte T helper.

LTreg : Lymphocyte T régulatrice.

P

PCR : Réaction de polymérisation en chaine.

PD1 : Mort cellulaire programmée 1.

PD-L1 : Mort-ligand programmé 1.

PI3K : Phosphoinositide-3-kinase.

S

SNP : Single-Polymorphism Nuceotid

T

TCR : Récepteur de cellules T.

T_m : Températures de fusion optimales T.

TNF-alpha : Tumor Necrosis Factor

Z

Zap70 : Protéine associée à la chaîne zêta de 70 kDa.

Introduction

Les maladies auto-immunes chroniques chez l'homme sont le résultat d'un échec de contrôle des cellules immunitaires auto réactives dans la périphérie. Ce contrôle est en grande partie réalisé par l'inhibition des cellules nouvellement activées et mémoire. Un certain nombre de voies de régulation immunitaire négatives ont été caractérisées y compris le corécepteur de surface cellulaire CTLA-4 (antigène cytotoxique des lymphocytes T-4) qui est un atténuateur critique de l'activation des lymphocytes T auto réactives (Scalapino and Daikh, 2008).

L'expression de CTLA-4 est induite à la surface des cellules T après avoir reçu un signal de costimulation des cellules présentatrices d'antigène (CPA) via l'engagement de CD28 sur la surface des LT .CTLA-4 atténue cette costimulation en inhibant les fonctions relayée par CD28 et par des effets directs sur les CPA via les mêmes ligands utilisés par CD28(Olive *et al.*, 2011).

Un grand nombre d'études d'association génétique ont identifié des polymorphismes mononucléotidiques – Single Polymorphism Nuceotid- (SNP) à l'intérieur ou à proximité du locus du gène *CTLA-4* associés à une grande variété de maladies auto-immunes (Rosenblum *et al.*, 2015).

Les méthodes pour distinguer et détecter ces SNP doivent être très spécifiques et sensibles. À cet égard, la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a fourni les performances analytiques nécessaires pour de nombreuses analyses moléculaires dans ce domaine (Matsuda, 2017).

Lors de la mise au point de la PCR, le choix des amorces est crucial. Ainsi, notre travail constitue une étape préliminaire pour des futures recherches sur l'association du polymorphisme de CTLA-4 à l'auto-immunité, cette étape est la conception d'amorces encadrant la variation et qui serviront à amplifier la séquence SNP recherché lors d'une PCR.

Chapitre 1. Revue de littérature

1. Les maladies auto-immunes

Les maladies auto-immunes courantes peuvent être considérées comme des troubles dus à des variations de la fonction de trois différents compartiments cellulaires ; le tissu cible du processus auto-immun; les cellules présentatrices d'antigène (APC); et les lymphocytes qui dirigent et médiatisent la réponse immunitaire adaptative(Pearce and Merriman, 2006).

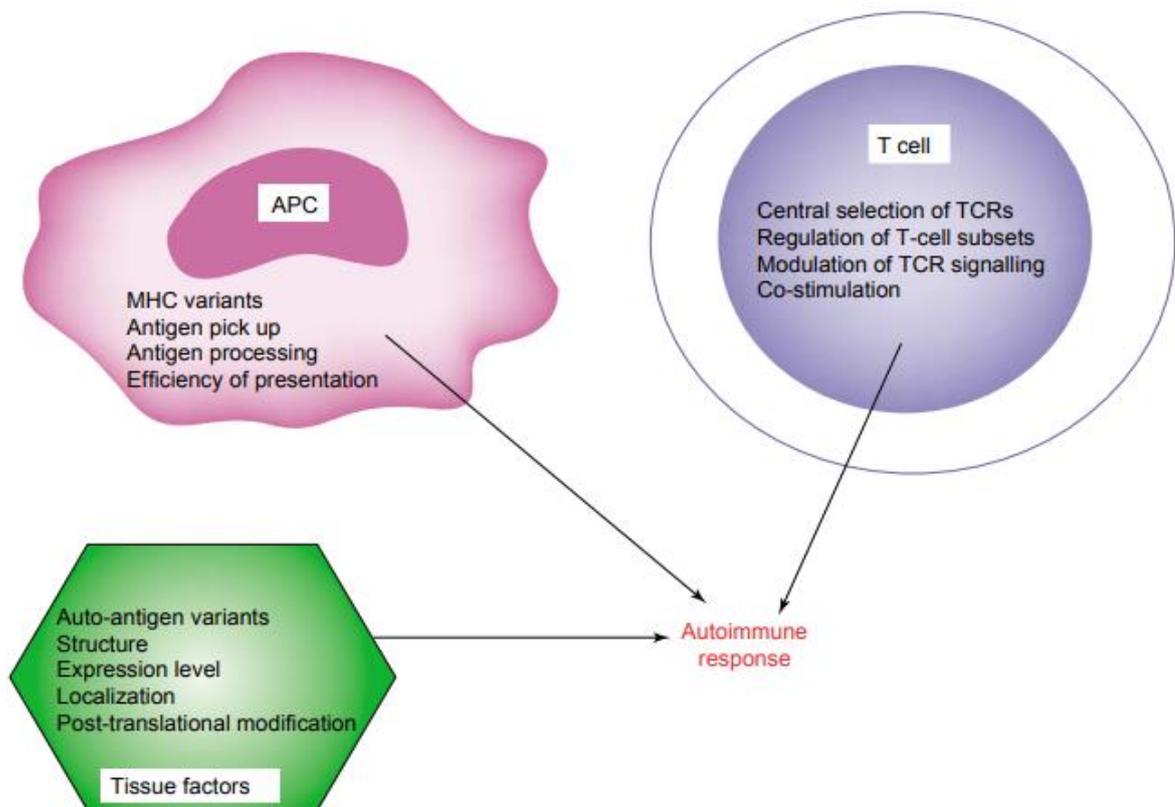


Figure 1. Mécanismes cellulaires qui pourraient contribuer à une maladie auto-immune

(Pearce and Merriman, 2006). APC : cellules présentatrice d'antigène ; MHC : Complexe Major d'Histocompatibilité ; T cell : lymphocytes T ; TCR : récepteur des cellules T.

1.1. Le tissu cible du processus auto-immun

Les antigènes qui forment la cible de l'attaque immunitaire peuvent être polymorphes et cela pourrait refléter des variations de structure, de quantité, localisation tissulaire ou subcellulaire et régulation de l'expression de l'antigène(Vallbracht, 2004).

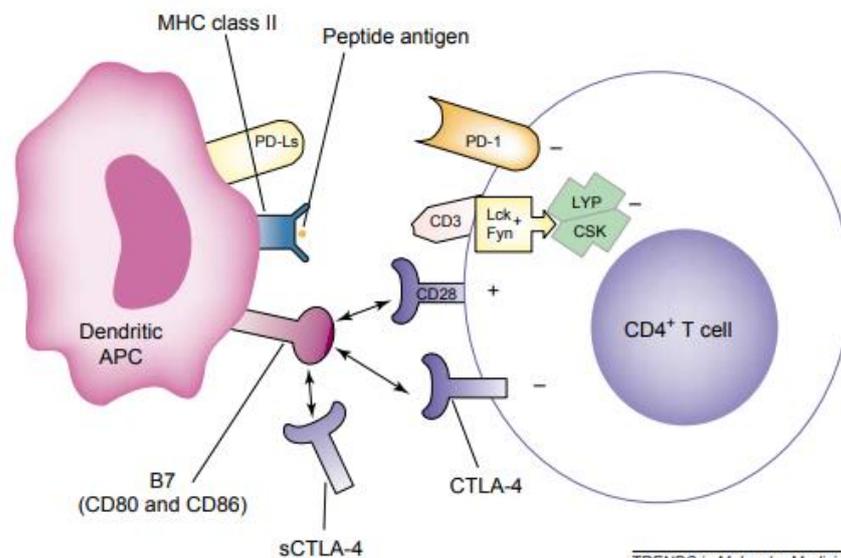
1.2. Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA)

Les CPA sont cruciaux dans la capture de l'antigène, son traitement et sa présentation aux cellules T auxiliaires (Th). Les CPA, comme les cellules dendritiques, sont essentiels dans l'initiation et la perpétuation des réponses immunitaires.

Le Complexe Major d'Histocompatibilité (CMH) est le locus polymorphe le plus étudié qui a des effets médiés par les CPA, chaque allèle du CMH (ou combinaison d'allèles) a des affinités différentes pour les antigènes peptidiques impliqués dans l'auto-immunité (Matzaraki et al., 2017).

1.3. Les cellules Th

Le troisième compartiment est constitué de cellules Th (CD4), qui sont les conducteurs de la réponse immunitaire adaptative. Plusieurs allèles variants de gènes avec des rôles établis dans les maladies auto-immunes sont exprimés en cellules Th y compris le CTLA-4 (figure 2) (Scalapino and Daikh, 2008).



TRENDS in Molecular Medicine

Figure 2. Une cellule présentatrice d'antigène (APC) interagissant avec une cellule T montrant le rôle des molécules d'auto-immunité clés (Pearce and Merriman, 2006). PD-L1 : Mort-ligand programmé 1 ; PD-1 : Mort cellulaire programmée 1 ; CD3 : cluster de différenciation 3 ; CD28 : cluster de différenciation 28 ; CTLA-4 : Antigène 4 associé aux lymphocytes T cytotoxiques ; CD80/CD86 : cluster de différenciation 80/86 ; Lck : protéine tyrosine kinase spécifique des lymphocytes ; CSK : C-terminal Src Kinase ; MHC : complexe majeur d'histocompatibilité.

2. Antigène 4 associé aux lymphocytes T cytotoxiques (CTLA-4)

2.1. Généralités

CTLA-4 est un homologue de cluster de différenciation 28 (CD28) exprimé par les LT avec une affinité élevée pour le CD 80 (ou également appelé B7/1) et CD86 (ou bien B7/2).(Buchbinder and Desai, 2016; Chambers *et al.*, 2001; Collins *et al.*, 2002). Cette liaison de CTLA-4 avec B7/1 et B7/2 peut empêcher le signal Co stimulateur fourni par la liaison CD28 /B7, elle peut en fait produire des signaux inhibiteurs de synapse de récepteur des cellules T(TCR), et par conséquent une diminution de la capacité d'interagir avec la CPA (figure 3). De ce fait, CTLA-4 est exprimé constitutivement dans les lymphocytes T régulateurs (LTreg)qui sont Les acteurs majeurs dans la tolérance et la régulation de réponse immunitaire par le contrôle ou la suppression des fonctions des lymphocytes T effectrices (LT eff).(Buchbinder and Desai, 2016; Chambers *et al.*, 2001; Parry *et al.*, 2005).

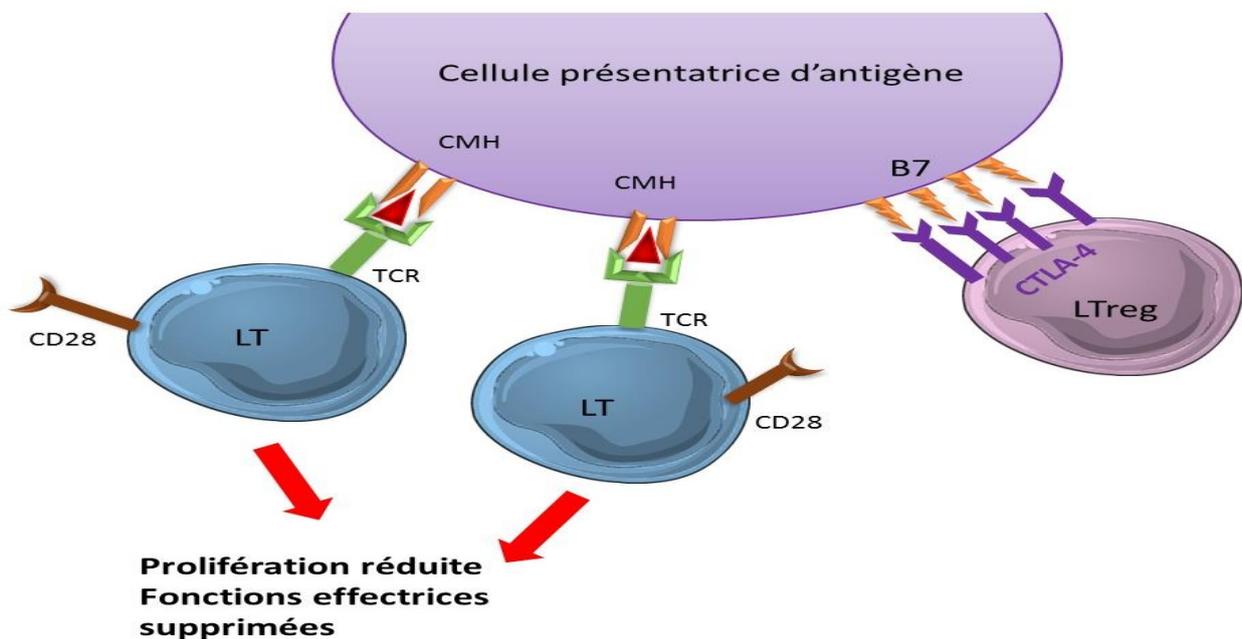


Figure 3. Conséquences des interaction B7/CTLA-4 sur les LT. (Buchbinder and Desai, 2016).

CTLA-4 indique un antigène 4 associé aux lymphocytes T cytotoxiques ; MHC : complexe majeur d'histocompatibilité ;

TCR : récepteur des cellules T ; Treg : cellules T régulateurs.

2.2. Expression de CTLA-4

Le CTLA-4 est exprimé à la fois par les lymphocytes T CD4 (LTCD4) et les lymphocytes TCD8 (LTCD8) et dans les LT naïve, LTeff, LTreg, dans les poumons, le sein, le rhinopharynx, carcinome gastrique et l'œsophage (Santoni *et al.*, 2018).

Une expression biaisée dans les ganglions lymphatiques, l'appendice, et autres (moelle osseuse ,vésicule biliaires , la vessie ...) (Fagerberg *et al.*, 2014).

Il est également exprimé par les cellules non lymphoïdes normales notamment les fibroblastes placentaires (Kaufman *et al.*, 1999), les cellules leucémiques et plusieurs lignées cellulaires tumorales (cancer de sein ,d'ovaire,...) (Contardi *et al.*, 2005).

Il existe 2 formes d'expressions de CTLA-4 : à la surface cellulaire suite à l'activation, et intracellulaire comme un stockage (Kwiecien et al., 2017).

2.3. Signalisation CTLA-4 / CD28

L'activation des LT résulte de l'interaction du TCR avec l'antigène présenté sur le CMH via la CPA et la co-stimulation médiée par le CD28 /B7. Dans le cas où le signal via le TCR est faible, la liaison CD28/B7 prédomine entraînant un signal d'activation, une production d'interleukine 2 (IL-2) et une prolifération et survie des LT.

Dans le cas d'un fort signal, le CTLA-4 est régulé positivement par un transport accru vers la surface cellulaire. En compétition avec le CD28 le CTLA-4 interagit avec le B7 limitant ainsi la production de l'IL-2 conduisant à la suppression du LTeff et l'apoptose. Ce signal est prédominé même si un signal Co-stimulateur est présent, et dans le contexte d'inhibition de LTeff la différenciation des LTreg est renforcé (figure 4). (Buchbinder and Desai, 2016 ; Yakoub and Schülke, 2019)..

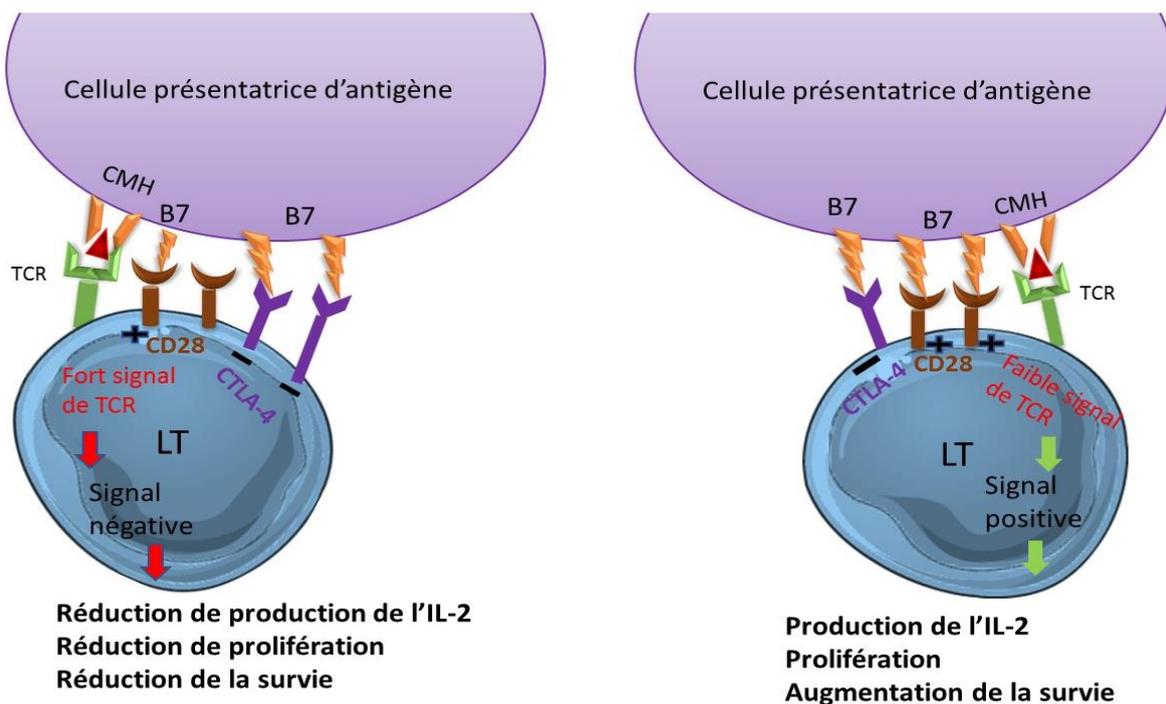


Figure 4. Inhibition médiée par CTLA-4 des lymphocytes T. (Buchbinder and Desai, 2016).

CTLA-4 indique un antigène 4 associé aux lymphocytes T cytotoxiques ; IL-2 : interleukine-2 ; MHC : complexe majeur d'histocompatibilité ; TCR : récepteur des lymphocytes T.

Après l'interaction avec B7, CTLA-4 va moduler négativement la signalisation du TCR en recrutant le phosphoinositide-3-kinase (PI3K), SH-2, et la protéine phosphatase 2A (PP2A) limitant ainsi la

formation de complexe protéique associée à la chaîne zêta de 70 kDa (Zap70), cette signalisation est traduite par une diminution d'expression de l'IL-2 par LT, son inhibition et son apoptose (figure 5). (Dieu-Nosjean and Caux, 2019).

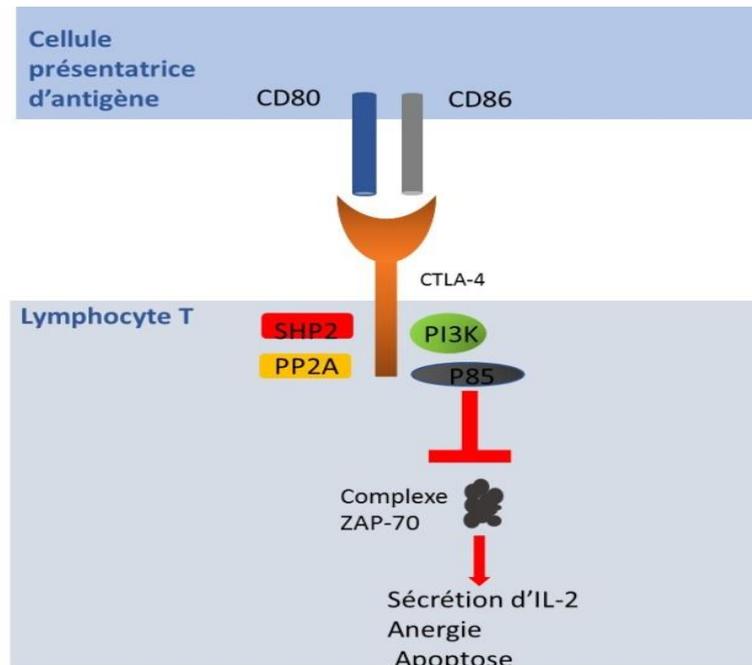


Figure 5. Principaux mécanismes de régulation de l'activation du lymphocyte T dépendante d'un signal TCR. (Dieu-Nosjean and Caux, 2019).

PI3K : phosphoinositide-3-kinase ; SHP2 :SRC domaine d'homologie région 2 contenant de la phosphatase-2 ; PP2A : protéine phosphatase 2A, PI3K : phosphoinositide-3-kinase, Zap70 : protéine associée à la chaîne zêta de 70 kDas ; IL-2 : interleukine 2.

2.4. Fonctions de CTLA-4

CTLA-4 est une molécule hautement endocytaire qui se lie à 2 ligands distincts, CD80(B7-1) et CD86(B7-2) conduisant à leur élimination des cellules opposées, ainsi il peut réguler la réponse immunitaire par la réduction de la capacité de CPA à stimuler via le CD28 ce qui explique la nature endocytaire de CTLA-4 et que le récepteur stimulateur et inhibiteur partage les mêmes ligands. Donc le système CD28/CTLA-4 fonctionne comme un régulateur d'activité des cellules T. (Rowshanravan et *al.*, 2018).

En plus de la liaison compétitive avec les ligands partagés avec CD28, le CTLA-4 augmente l'activation des LT en produisant des signaux inhibiteurs toniques au cours de la tumorigènes et affaiblissant la réponse immunitaire contre la tumeur. En plus, via un signal inverse de B7 le CTLA-4 conduit à l'inhibition de la prolifération cellulaire par le catabolisme des acides aminés et il peut supprimer la signalisation proximale de TCR en inhibant la formation de Zap70. (Wang et *al.*, 2016).

Cette liaison inhibe également la progression du cycle cellulaire et les facteurs de transcription : facteur nucléaire κ B(NF- κ B),facteur nucléaire des cellules T activées(NF-AT),protéine activatrice1 (AP-1), et régule l'adhésion médiée par l'antigène-1 associé à la fonction lymphocytaire (LFA-1)(Valk et *al.*, 2008)

Donc CTLA-4 est un régulateur négatif dans les réponses immunitaires des LT et un point de contrôle clé régulant les réponses auto-immunes et antitumorales. (Khailaie et *al.*, 2018)

2.5. Gène *CTLA-4*

Le gène *CTLA-4* est situé sur le chromosome 2q33.2 (figure6). il est constitué de 4 exons et 3 introns (Brunet et *al.*, 1987).

le peptide leader est codée par l'exon 1, le domaine immunoglobine(Ig) codé par l'exon 2, et les domaines transmembranaires et cytoplasmiques hydrophobes sont codés par les exons 3 et 4(Kailashiya et *al.*, 2019; Teft et *al.*, 2006).

Il existe 3 isoformes de ce gène : une protéine CTLA-4 (fiCTLA-4) membranaire contient 149 acides aminées où les 4 exons sont exprimés, ainsi qu'un autre protéine mutant CTLA-4 sans domaine transmembranaire (soluble) (sCTLA-4) et une protéine mutante CTLA-4 dépourvu de domaine extracellulaire et transmembranaire (Ghaderi, 2011).

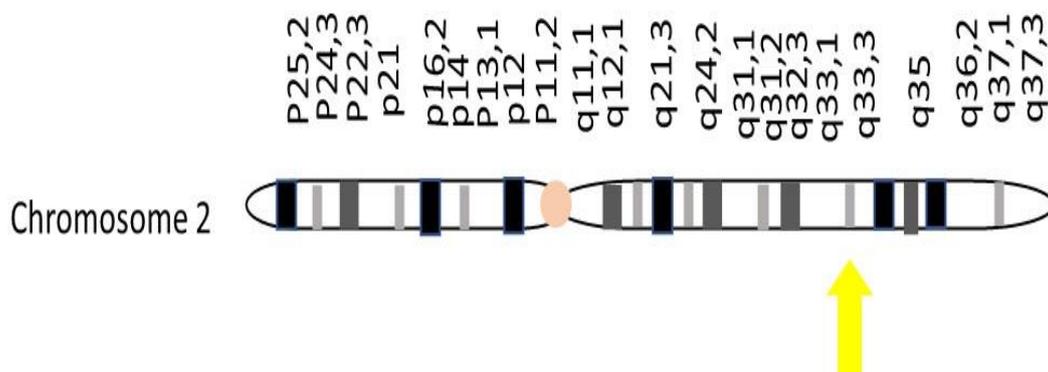


Figure 6. Localisation du gène *CTLA-4* sur le chromosome 2 humain .

2.6. Structure de CTLA-4 et mutations

2.6.1. Structure

CTLA-4 est un membre de super famille des immunoglobulines composée d'un domaine V ,un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique .(Lee et *al.*, 2019).

il est constitué de 2 feuilles beta, qui forment un homodimère liées par une liaison disulfure médiée par cystéine, il contient des chaines lourds (VH) , des chaines légères (VL) et des boucles CDR1 ,CDR2, et CDR3 (figure 7).(He et *al.*, 2017).

Cette molécule contient 4 exons : l'exon 1 code pour le peptide signal, l'exon 2 code pour le domaine extracellulaire contenant les sites de liaisons au CD80/CD86 et le site de dimérisation,

l'exon 3 pour le domaine transmembranaire et l'exon 4 pour la queue cytoplasmique. (Mitsuiki et *al.*, 2019).



Figure 7. Représentation de la structure de CTLA-4 (He et *al.*, 2017).

2.6.2. Mutations

Les données actuelles publiées sur les mutations *CTLA-4* montrent au total 52 mutations hétérozygotes *CTLA-4* germinale : 30 faux sens, 11 insertions ou délétions (in/del), et 7 non-sens, 9 entre eux dans l'exon 2 et 8 dans l'exon 3 avec 4 mutations de site de dépistage (figure 8) (Mitsuiki et *al.*, 2019). De ce fait, les patients atteints de mutations *CTLA-4* présentent des maladies auto-immunes, une lymphoprolifération et hypogammaglobulinémie. Les patients peuvent également développer de nombreuses infections virales (c'est le cas de virus d'Epstein Barr) (Hoshino et *al.*, 2018). et un risque élevé de cancer (Egg et *al.*, 2018)

La distribution de 52 mutations hétérozygotes dans la lignée germinale de *CTLA-4* est montrée : 30 mutations faux sens, 11 insertions ou délétion (in/del) et 7 mutations non-sens (figure 8) (Mitsuiki et *al.*, 2019)

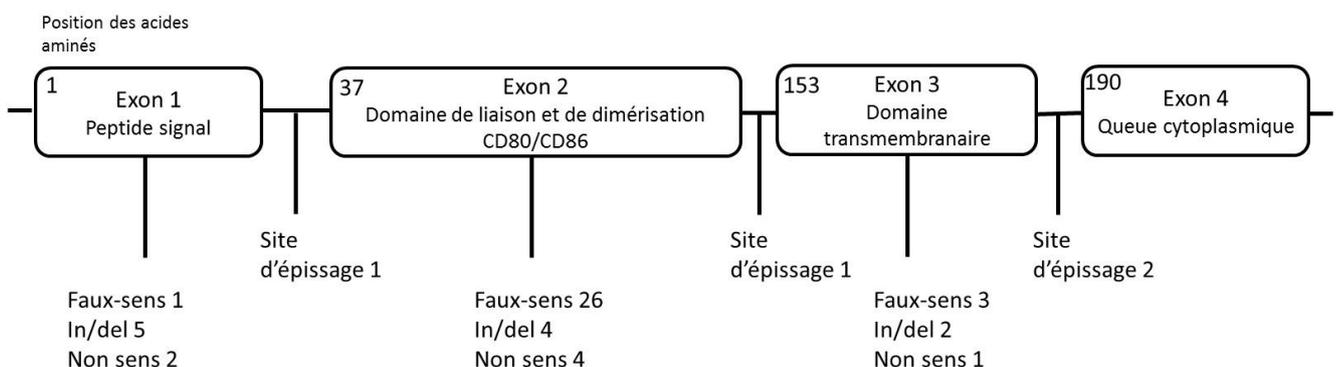


Figure 8. La Structure et les mutations du CTLA-4 (Mitsuiki et *al.*, 2019).

2.7. CTLA-4 et auto-immunité

Il a été constaté que la diminution d'expression du CTLA-4 affecte à la fois la tolérance centrale, périphérique et la suppression médiée par les LTreg conduisant ainsi à différents troubles d'auto-tolérance et induisant de nombreux déficits auto-immunes (Klocke et al., 2016). Généralement, des niveaux accrus de CTLA-4 soluble (sCTLA-4) sont détectés dans plusieurs maladies incluant la myasthénie, lupus, diabète de type 1, sclérodémie systémique, maladie cœliaque..., de ce fait il a été suggéré que cette augmentation de taux sérique de sCTLA-4 inhibe spécifiquement l'activation précoce de LT en bloquant l'interaction CD80/CD86 avec le CD28 (Saverino et al., 2010).

2.7.1. Polymorphisme de gène CTLA-4

Le polymorphisme dans l'un des positions du gène *CTLA-4* qui peut changer aux moins une séquence d'acide aminé dans la séquence leader, peut affecter les fonctions de CTLA-4 induisant alors différents types des maladies auto-immunes (Kailashiya et al., 2019). Le polymorphisme de gène *CTLA-4* précisément en position +49 dans le gène (allèle A) peut augmenter sa fonction inhibitrice et diminuer l'activation des LT, entraînant une faible réponse immunitaire contre les cancers et augmente le risque des maladies auto-immunes notamment sclérose systémique et polyarthrite rhumatoïde et aussi de cancer du col et de l'utérus (Tanhapour et al., 2017). Il est également impliqué même dans les maladies thyroïdiennes auto-immunes (Ramgopal et al., 2018) et d'autres maladies auto-immunes (tableau 1). Tels que le diabète insulino-dépendant, la thyroïdite de Hashimoto, la maladie cœliaque, l'arthropathie associée à la thyroïde (fourni par Ref Seq. jul 2008) la cytopénie, l'entéropathie avec des symptômes respiratoires et neurologique (Mitsuiki et al., 2019), maladie d'Addison et la maladie rénale néphrotique (Wolff et al., 2015).

Tableau 1. Polymorphismes du gène CTLA-4 et diverses maladies auto-immunes. (Romona et al., 2013). *+49 A / G (T / A) semble être le SNP le plus étudié. SNP : Polymorphisme mononucléotidique.

Maladie auto-immune	SNP
Diabète de type 1	+49 A/G (T/A)
Le lupus érythémateux disséminé	+49 A/G (T/A) CT60 G/A -1722 T/C
Maladie de Graves	+49 A/G (T/A) -318 C/T CT60 G/A
La polyarthrite rhumatoïde	+49 A/G (T/A)
Thyroïdite d'Hashimoto	+49 A/G (T/A)

3. Réaction de polymérisation en chaîne PCR

3.1. Définition

La réaction de polymérisation en chaîne PCR est une technologie d'amplification enzymatique qui utilise principalement l'ADN polymérase I de *Thermus aquaticus* (Taq Pol)) qui permet d'obtenir un grand nombre (plusieurs millions) à partir d'un fragment d'ADN (Garibyan and Avashia, 2013; Saiki et al., 1985).

Après la publication de la méthode origine en 1985, la procédure de base de PCR a été modifiée selon les besoins de chaque expérience.

3.2. Principe

Le principe de la PCR est basé sur l'obtention de grands quantités des séquences d'ADN à partir d'un échantillon d'ADN, la réaction est effectuée dans un mélange réactionnel qui comporte l'ADN matrice, la Taq polymérase, les amorces, et les quatre désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) dans une solution tampon (Maheaswari et al., 2016). La réaction est réalisé automatiquement grâce à un thermocycleur (Uhel et al., 2019).

3.3. Etapes

La réaction se réalise en 3 étapes :

1_ Dénaturation : à (95°C) de 30 secondes à 1 minute pour séparer les 2 brins d'ADN (figure 9).

2_ Hébridation : des amorces à (54-64°C) et chaque une s'apparie avec leur brin complémentaire d'ADN dénaturé (figure 9).

3_ Elongation : à (72°C) l'ADN polymérase (Taq pol) synthèse le brin complémentaire de chaque brin d'ADN matrice à partir de dNTP dans la solution (figure 9).

Les 3 étapes forment un cycle ,et la PCR se réalise en 25 à 35 cycles ,et puisque le nombre de copies est multipliés à chaque cycle ,par 2, donc le nombre totale de séquences copies est de 2^n après n cycle (figure 9) (Garibyan and Avashia, 2013; Uhel et al., 2019).

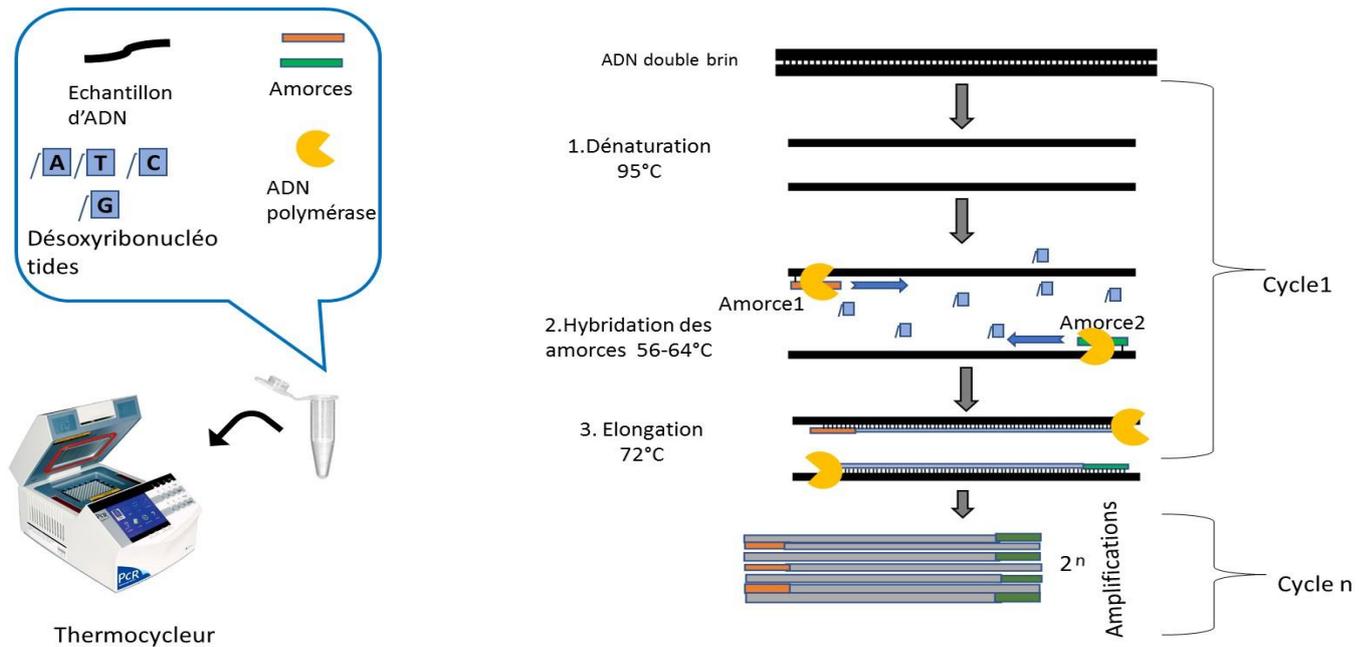


Figure9. Principe de la réaction de polymérisation en chaine PCR.(Uhel et al., 2019).

3.4. Choix d'amorce

3.4.1. Définition

Les amorces sont des courtes fragments d'ADN avec une séquence définie complémentaire à une partie du gènes cibles qui doit être détecté et amplifié, ceux-ci servent de point d'extension sur lequel la Taq polymérase peut s'appuyer .(Garibyan and Avashia, 2013).

La longueur de l'amorce doit être de 15 à 30 nucléotides ,le pourcentage de guanine et cytosine devrait se situer entre 40 et 60% ,les températures de fusion optimales (T_m) finale entre les 2 amorces sens et antisens ne doit pas différer plus de 5°C (Lorenz, 2012)

Ces amorces sont dits universels (Kumar et al., 2011).

3.4.2. Choix d'amorces

3.4.2.1. La spécificité

Pour un bon chemin de processus de PCR ,il faut que nos amorces sont spécifique à la région d'ADN que l'on veut amplifier, donc il faut déterminer les séquences d'amorces et d'ADN et il devrait y avoir un appariement parfait des bases entre l'extrémité 3' de l'amorce et 5' d'ADN, et il faut éviter les dimères d'amorces, la structure en épingle à cheveux dû à l'hybridation autonome(Rychlik, 1993).

3.4.2.2. Outils

Des outils de conception d'amorces polyvalent robuste et implémenté qui conçoit des amorces de PCR spécifique à une cible tels Primer 3, BLAST ,Ensemble (Ye et al., 2012).

3.4.2.3. Chercher les bonnes amorces

- ✓ La taille : la taille optimal d'une bonne paire d'amorce est de 18 à 22 paires de bases (Lorenz, 2012).
- ✓ La température de fusion : pour laquelle l'amorce double brin se dissocie , la température optimale T_m doit se située entre 52 et 58 °C et que la température d'appariement doit être d'environ 5 °C (Lorenz, 2012).
Elle se détermine par la formule : $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$.
- ✓ Le pourcentage optimale en G-C doit se situé entre 40 et 60% et dans les cinq derniers bases à l'extrémité 3' doit avoir aux moins deux pour que la réplication peut se démarrer (Bustin and Huggett, 2017; Lorenz, 2012).

3.5. Problématique

L'auto-immunité est un processus hautement régulé à l'aide des différents acteurs, leur problème majeur est dû à des variations de la fonction de trois différents compartiments cellulaires ; le tissu cible du processus auto-immun ; les cellules présentatrices d'antigène (APC) ; et les lymphocytes qui dirigent et médient la réponse immunitaire adaptative. Plusieurs allèles variants de gènes avec des rôles établis dans les maladies auto-immunes sont exprimés par les cellules Th y compris le CTLA-4 qui est en principe un régulateur négatif dans les réponses immunitaires des LT et un point de control clé régulant les réponses auto-immunes. De ce fait notre travail constitue une étape préliminaire pour des futures recherches sur l'association du polymorphisme de CTLA-4 à l'auto-immunité, cette étape est la conception d'amorces encadrant la variation et qui serviront à amplifier la séquence SNP recherché lors d'une PCR.

3.6. Objectif

Concevoir avec spécificité un couple d'amorces encadrant le SNP du gène *CTLA-4* afin d'initier par la suite la PCR.

3.7. But

Utiliser les amorces conçues lors de la réalisation des futures recherches sur l'association du gène *CTLA-4* aux maladies auto-immunes.

Chapitre 2. Matériel et méthodes

1. Conception des amorces pour la PCR

La bio-informatique est un outil essentiel dans la recherche fondamentale et appliquée en biotechnologie et en sciences biomédicales. Une séquence d'amorces optimale et une concentration d'amorce appropriée sont essentielles pour une spécificité et une efficacité maximale de la PCR.

Donc La conception des amorces est sans doute le paramètre le plus important pour le succès de ce processus.

Un couple d'amorces mal conçue peut entraîner peu ou pas de produit en raison d'une amplification non spécifique et / ou d'une formation de dimères d'amorces, qui peut devenir suffisamment compétitive pour supprimer la formation de produit.

Il existe plusieurs outils en ligne destinés à concevoir des amorces de PCR efficaces pour les analyses de séquences nucléiques en biologie moléculaire.

Notre but est de fournir des recommandations générales pour la conception et l'utilisation des amorces de PCR.

- **Sélection des amorces :**

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

1.1. La longueur de l'amorce :

En général, les oligonucléotides entre 18 et 24 bases sont spécifiques de 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 de produit amplifié.

1.2. La température de fusion (T_m) :

Une température de fusion de 55–72 °C donnent les meilleurs résultats, elle correspond à une longueur d'amorce de 18–24 bases. Les deux amorces d'oligonucléotides doivent être conçues de sorte qu'elles aient des températures de fusion semblables.

1.3. 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.

De ce fait, les amorces doivent être choisies de telle sorte qu'elles aient une séquence unique dans l'ADN matrice qui doit être amplifié, une température de fusion de 55–72 °C donne les meilleurs résultats. Une amorce conçue avec une séquence hautement répétitive conduira à une traînée lors de l'amplification d'ADN génomique.

1.4. Les séquences d'amorces complémentaires :

Les amorces doivent être conçues absolument sans aucune complémentarité de séquence, ni intra-amorce ni partielle 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 se former.

La complémentarité de séquence partielle dans les régions centrales de deux amorces, sens et antisens, 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.

1.5. La teneur en G/C et suites poly pyrimidine (T, C) ou poly purine (A, G) :

Idéalement, les amorces devraient être composées de 45-55 % de GC. 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.

1.6. La séquence à l'extrémité 3' :

Il est établi que la position terminale 3' dans les amorces PCR est essentielle pour empêcher le désamorçage, c'est pour cela qu'elle doit être riche en G et C.

2. Recherche de la séquence génomique de référence du gène *CTLA-4*

Le gène de la protéine 4 associée aux lymphocytes T cytotoxiques ou *CTLA-4* ou bien CD152 est situé sur le bras long du chromosome2 (2q33.2).

La conception des amorces commence par la recherche de la séquence de référence du gène *CTLA-4*, pour cela on utilise la base de données Ensembl. En allant sur le site www.ensembl.org en inscrivant le nom du gène et spécifier l'espèce humaine (figure 10).

The screenshot shows the Ensembl genome browser interface. The search bar contains 'ctla-4' and the results show 9021 results corresponding to 'ctla-4'. The results are organized into sections for different species and transcripts. The human section is expanded, showing several transcripts and their associated protein isoforms. The first entry is 'CTLA4 (gène humain)' with the Ensembl ID ENSG00000163599. Below it, several protein isoforms are listed, including 'CTLA4-205 (Transcription humaine)' and 'CTLA4-201 (Transcription humaine)'. Each entry includes a brief description and links to various data types like 'Tableau des variantes', 'Phénotypes', 'Emplacement', etc.

Figure 10. Recherche de la séquence du gène *CTLA-4* sur la base de données Ensembl.

La plateforme de la base de données montre où la séquence complète du gène peut être trouvée sous le code [ENSG00000163599](#).

La séquence génomique entière est obtenue grâce à l'icône « Séquence ».

La séquence du gène est sous divisée en séquences codantes (caractères en rouge) et séquences non codantes (caractères en noir).

Pour des raisons pratiques, cette séquence est copiée dans un fichier word.

3. Conception des amorces par l'outil primer-BLAST

Dans la base de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI) nous avons utilisé le logiciel Primer blast dans le site <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> afin de concevoir les amorces recherchées.

Les étapes du primer-BLAST :

Étape 1 : Copier la séquence d'intérêt dans la fenêtre du logiciel

Étape 2 : Renseigner la position du nucléotide du départ de l'amplification et la taille maximale de l'amplicon souhaité.

Étape 3 : Supprimer les intervalles non souhaités

Étape 4 : Cocher show results in a new window, puis cliquer sur Get primers (figure 12).

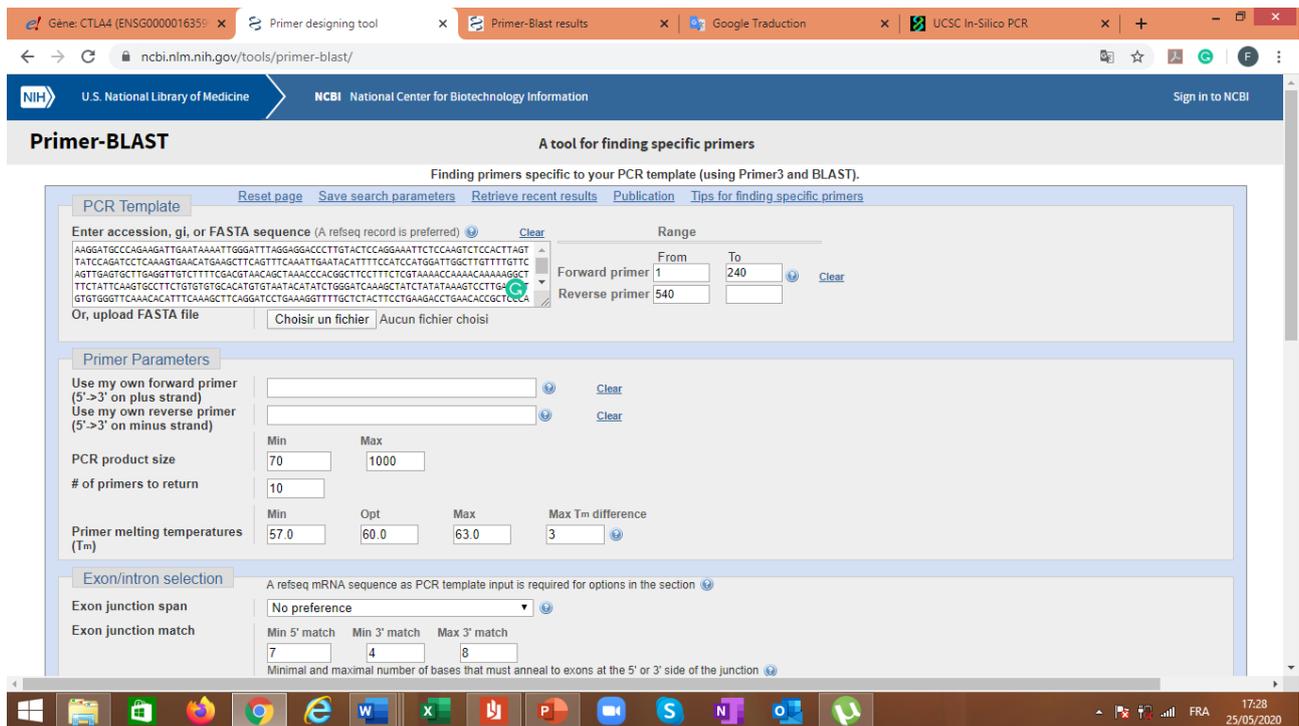


Figure 11. L'outils Primer BLAST.

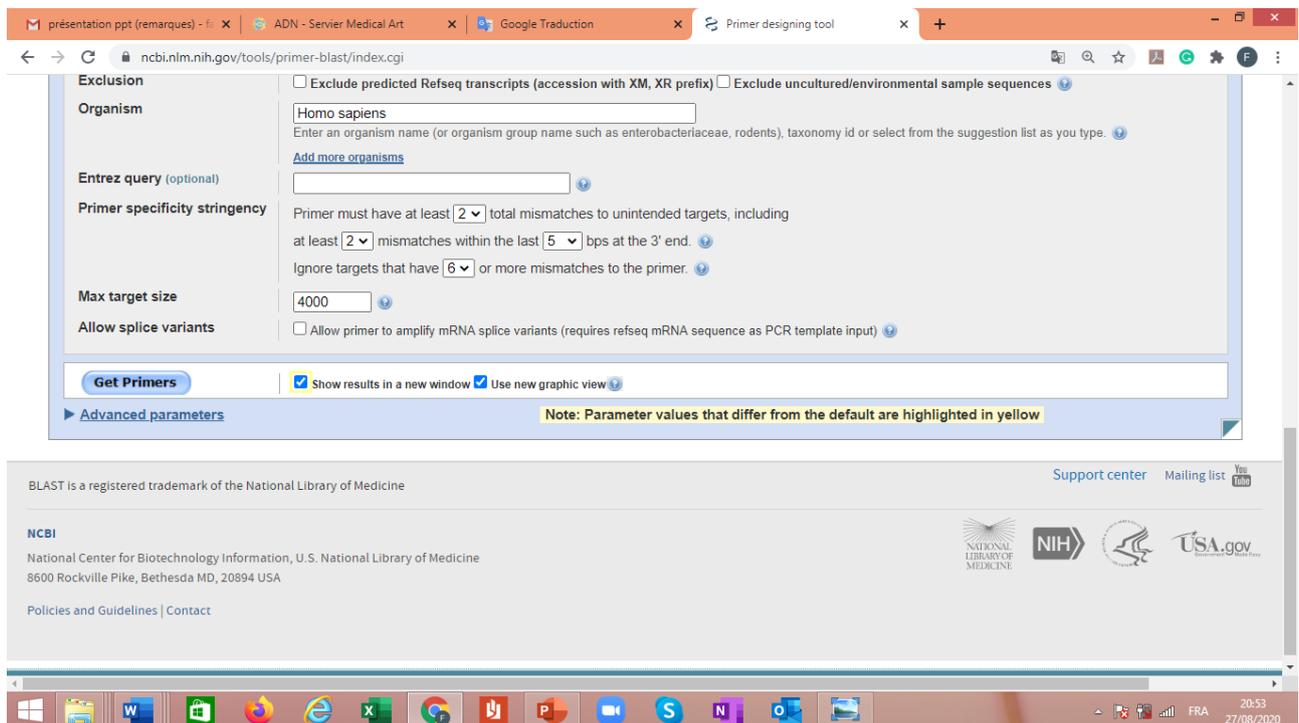


Figure 12. La dernière étape dans Primer BLAST

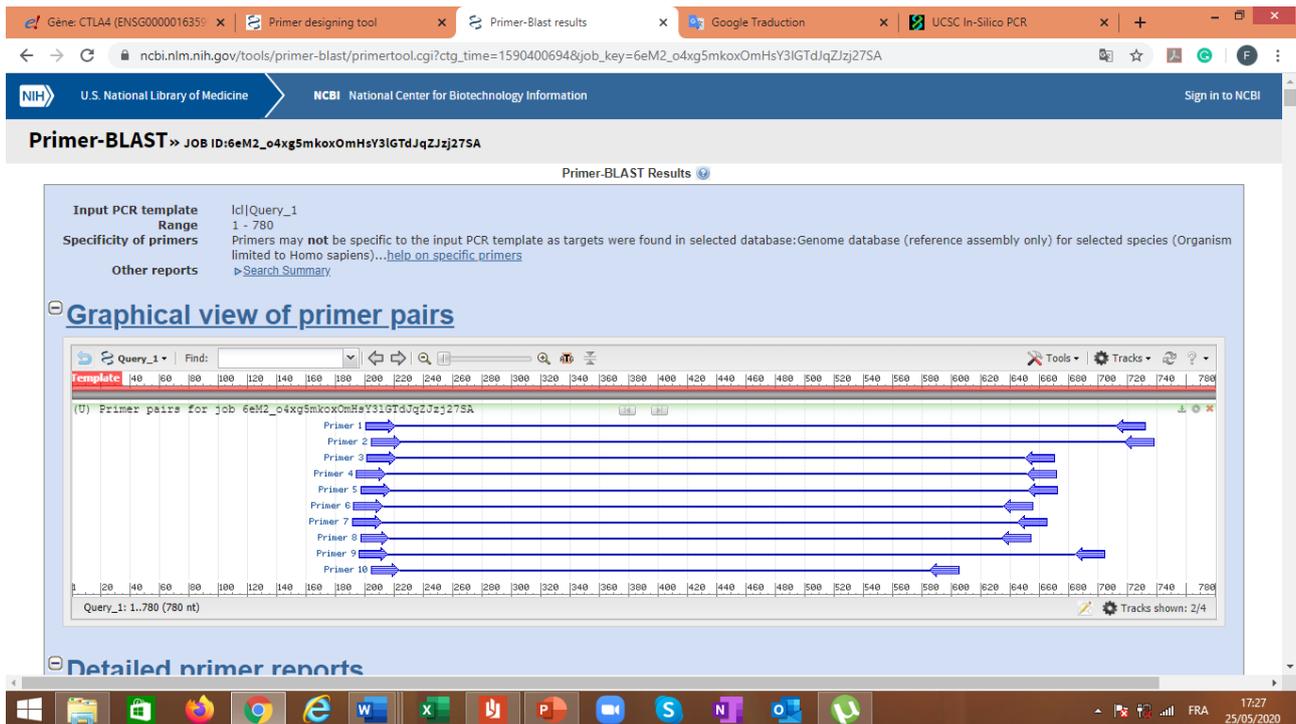


Figure 14. Les résultats de la conception d'amorces par Primer-BLAST.

Dans un premier temps le couple d'amorces donné par l'outil Primer-blast, forme des hybridations aspécifiques mais pour donner des produits d'amplification qui sont supérieures à 3000 paires de bases (pb), donc ce résultat n'est pas pris en compte parce que les produits de PCR de plus de 3000 pb sont difficiles à amplifier.

Les autres paires d'amorces peuvent tous amplifier des produits aspécifiques de taille inférieure à 1000 paires de bases Ces paires d'amorces sont donc à éliminer.

La paire d'amorces choisit répond aux critères de sélections de bonnes paires d'amorces :

La température d'hybridation des amorces est de 60°C (figure 15), une température de 55 à 72 ° C donne les meilleurs résultats.

La longueur des amorces est de 19 et 20 nucléotides (figure 14). Les oligonucléotides entre 18 et 24 bases sont extrêmement spécifiques de la séquence, à condition que la température d'hybridation soit optimale. La longueur de l'amorce est également proportionnelle à l'efficacité de l'hybridation. En général plus l'amorce est longue, moins l'hybridation est efficace.

Le couple d'amorces donne un produit d'amplification d'une longueur de 508 paires de bases.

La teneur en GC : est de 55 et 57%. La teneur en GC d'une amorce doit être comprise entre 40 et 60%.

Primer pair 9

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AGCTAAACCCACGGCTTCC	Plus	19	197	215	60.00	57.89	4.00	1.00
Reverse primer	CTTATTTGCTGCCGCCAAC	Minus	20	704	685	60.46	55.00	4.00	1.00
Product length	508								

Products on potentially unintended templates

>NC_000002.12 Homo sapiens chromosome 2, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 508
Features associated with this product:
[cytotoxic T-lymphocyte protein 4 isoform CTLA4-TM precursor](#)
[cytotoxic T-lymphocyte protein 4 isoform CTLA4-4de1TM](#)

Forward primer 1 AGCTAAACCCACGGCTTCC 19
Template 203867727 203867745

Reverse primer 1 CTTATTTGCTGCCGCCAAC 20
Template 203868234 203868215

>NC_000005.10 Homo sapiens chromosome 5, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 2175
Features flanking this product:
[8323 bp at 5' side: E3 ubiquitin-protein ligase NARCH11](#)
[261585 bp at 3' side: zinc finger protein 622](#)

Forward primer 1 AGCTAAACCCACGGCTTCC 19
Template 16190071 T...C...A...CT..... 16190053

Reverse primer 1 CTTATTTGCTGCCGCCAAC 20
Template 16187897 .C.C..G.....G. 16187916

>NC_000004.12 Homo sapiens chromosome 4, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 2718

Figure 15. La bonne paire d'amorce.

3. Confirmations des résultats

Afin de vérifier la fiabilité des amorces, nous avons soumis les séquences des amorces à une analyse de confirmation qui se fait par in silico PCR (PCR virtuelle). Ceci s'effectue par un programme dans le site suivant : <https://genome.ucsc.edu/>.

Les résultats de cette confirmation ont donné le produit situé sur le chromosome 2 (figure 16).

Donc ces résultats nous confirment la fiabilité et la spécificité des amorces que nous avons conçues.

UCSC In-Silico PCR

>chr2:20386727+203868234 508bp AGCTAAACCCACGGCTTC CTTATTTGCTGCCCAAC

```
AGCTAAACCCACGGCTTCctttctgtaaaacaaaagccttc
tattcaagtcctctctgtgtgacatgtgatcacatctgggctca
aagctatctataaaagctctgtgattctgtgtgggtcaaacattca
aagcttcaggatcctgaaggttttgctactctcgaagacctgaaca
ccgctccataaagccatggcttgccttgatttcagcggcacaggctc
agctgaacctggctaccaggacctggcctgacctctctgttttctt
ctttcatccctgtctctcgaagtgatgagactttggagcatgaa
gatggaggaggttttctcctacctgggttcattgtttcagcagctaa
aggcagtgatttatgcaaaagcagaagttaaaggtaaaactccaactg
gcttgctgctctctgtattccaggccagcaggagcaGTTGGGCGGCA
CAAAATAG
```

Primer Melting Temperatures

Forward: 61.5 C agctaaacccagccttc
Reverse: 64.9 C cttatttgcctgcccaac
The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration. The code to calculate the melting temp comes from [Primer3](#).

Help

[What is chr_alt & chr_fix?](#)
[Replicating in-Silico PCR results on local machine](#)

Figure 16. Confirmation des résultats par in silico PC.

Conclusions et perspectives

La PCR est utilisée dans de nombreux domaines de la biologie et de la médecine, y compris la recherche en biologie moléculaire, le diagnostic médical et même certaines branches de l'écologie. De ce fait, il s'avère plus qu'important d'élaborer des amorces. Ces derniers doivent être sélectionnés afin de donner la meilleure spécificité possible, tout en maintenant un processus d'amplification PCR efficace.

Dans la présente étude, nous avons jugé pertinent de concevoir des amorces pour étudier le polymorphisme du gène CTLA-4, qui est un régulateur négatif dans les réponses immunitaires des LT et un point de contrôle clé régulant les réponses auto-immunes. Et dont le produit est associé à une grande variété de maladies auto-immunes comme les maladies thyroïdiennes auto-immunes, le diabète insulino-dépendant, la thyroïdite de Hashimoto, la maladie cœliaque et d'autres.

Nous avons élaboré grâce à ce travail, un couple d'amorce qui encadre le polymorphisme SNP de l'exon 1 du gène *CTLA-4* associé à la dérégulation immunitaire qui est considéré comme préfigurant de plusieurs maladies graves. Le couple d'amorce obtenus répond aux critères de sélections de bonnes paires d'amorces : une température d'hybridation de 60°C. une longueur de l'amorce sens est de 19 nucléotides et l'amorce reverse de 20 nucléotides. Une teneur en GC de l'amorce sens est de 57%. Et de l'amorce reverse de 55%. Et que le premier produit à une longueur de 508 paires de bases (spécifique) et les autres produits sont tous une longueur supérieure à 1000pb (aspécifique).

L'étude de la variation génétique au niveau de ce gène, consiste à utiliser ces amorces afin d'amplifier la région encadrant le polymorphisme, ceci représente une étape préalable, et indispensable à toute analyse de biologie moléculaire impliquant ce polymorphisme (PCR/Séquençage, RT/PCR ...).

Chapitre 6. Bibliographie

B

Brunet, J.-F., Denizot, F., Luciani, M.-F., Roux-Dosseto, M., Suzan, M., Mattei, M.-G., and Golstein, P. (1987). A new member of the immunoglobulin superfamily—CTLA-4. *Nature* 328, 267–270.

Buchbinder, E.I., and Desai, A. (2016). CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am. J. Clin. Oncol.* 39, 98–106.

Bustin, S., and Huggett, J. (2017). qPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification* 14, 19–28.

C

Chambers, C.A., Kuhns, M.S., Egen, J.G., and Allison, J.P. (2001). CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 565–594.

Collins, A.V., Brodie, D.W., Gilbert, R.J.C., Iaboni, A., Manso-Sancho, R., Walse, B., Stuart, D.I., van der Merwe, P.A., and Davis, S.J. (2002). The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity* 17, 201–210.

Contardi, E., Palmisano, G.L., Tazzari, P.L., Martelli, A.M., Falà, F., Fabbi, M., Kato, T., Lucarelli, E., Donati, D., Polito, L., et al. (2005). CTLA-4 is constitutively expressed on tumor cells and can trigger apoptosis upon ligand interaction. *Int. J. Cancer* 117, 538–550.

D

Dieu-Nosjean, M.-C., and Caux, C. (2019). La biologie des cibles PD-1 et CTLA-4 et la question des biomarqueurs. *Med Sci (Paris)* 35, 957–965.

E

Egg, D., Schwab, C., Gabrysch, A., Arkwright, P.D., Cheesman, E., Giulino-Roth, L., Neth, O., Snapper, S., Okada, S., Moutschen, M., et al. (2018a). Increased Risk for Malignancies in 131 Affected CTLA4 Mutation Carriers. *Front. Immunol.* 9, 2012.

F

Fagerberg, L., Hallström, B.M., Oksvold, P., Kampf, C., Djureinovic, D., Odeberg, J., Habuka, M., Tahmasebpoor, S., Danielsson, A., Edlund, K., et al. (2014). Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol. Cell Proteomics* 13, 397–406.

G

Garibyan, L., and Avashia, N. (2013). Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology* 133, 1–4.

Ghaderi, A. (2011). CTLA4 gene variants in autoimmunity and cancer: a comparative review. *Iran J Immunol* 8, 127–149.

H

He, M., Chai, Y., Qi, J., Zhang, C.W.H., Tong, Z., Shi, Y., Yan, J., Tan, S., and Gao, G.F. (2017). Remarkably similar CTLA-4 binding properties of therapeutic ipilimumab and tremelimumab antibodies. *Oncotarget* 8, 67129–67139.

Hoshino, A., Tanita, K., Kanda, K., Imadome, K.-I., Shikama, Y., Yasumi, T., Imai, K., Takagi, M., Morio, T., and Kanegane, H. (2018). High frequencies of asymptomatic Epstein-Barr virus viremia in affected and unaffected individuals with CTLA4 mutations. *Clinical Immunology* 195, 45–48.

K

Kailashiya, V., Sharma, H.B., and Kailashiya, J. (2019). Role of CTLA4 A49G polymorphism in systemic lupus erythematosus and its geographical distribution. *J. Clin. Pathol.* 72, 659–662.

Kaufman, K.A., Bowen, J.A., Tsai, A.F., Bluestone, J.A., Hunt, J.S., and Ober, C. (1999). The CTLA-4 gene is expressed in placental fibroblasts. *Mol. Hum. Reprod.* 5, 84–87.

Khailaie, S., Rowshanravan, B., Robert, P.A., Waters, E., Halliday, N., Badillo Herrera, J.D., Walker, L.S.K., Sansom, D.M., and Meyer-Hermann, M. (2018). Characterization of CTLA4 Trafficking and Implications for Its Function. *Biophysical Journal* 115, 1330–1343.

Klocke, K., Sakaguchi, S., Holmdahl, R., and Wing, K. (2016). Induction of autoimmune disease by deletion of CTLA-4 in mice in adulthood. *Proc Natl Acad Sci USA* 113, E2383–E2392.

Kumar, P.S., Brooker, M.R., Dowd, S.E., and Camerlengo, T. (2011). Target Region Selection Is a Critical Determinant of Community Fingerprints Generated by 16S Pyrosequencing. *PLoS ONE* 6, e20956.

Kwiecien, I., Skirecki, T., Polubiec-Kownacka, M., Raniszewska, A., and Domagala-Kulawik, J. (2019). Immunophenotype of T Cells Expressing Programmed Death-1 and Cytotoxic T Cell Antigen-4 in Early Lung Cancer: Local vs. Systemic Immune Response. *Cancers (Basel)* 11.

L

Lee, H., Lee, S., and Heo, Y.-S. (2019). Molecular Interactions of Antibody Drugs Targeting PD-1, PD-L1, and CTLA-4 in Immuno-Oncology. *Molecules* 24, 1190.

Lorenz, T.C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *JoVE* 3998.

M

Maheaswari, R., Kshirsagar, J., and Lavanya, N. (2016). Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology. *J Indian Soc Periodontol* 0, 0.

Matsuda, K. (2017). PCR-Based Detection Methods for Single-Nucleotide Polymorphism or Mutation: Real-Time PCR and Its Substantial Contribution Toward Technological Refinement. *Adv Clin Chem* 80, 45–72.

Matzaraki, V., Kumar, V., Wijmenga, C., and Zhernakova, A. (2017). The MHC locus and genetic susceptibility to autoimmune and infectious diseases. *Genome Biol.* 18, 76.

Merriman, T.R., and Pearce, S.H.S. (2006). Genetic progress towards the molecular basis of common autoimmunity. *Discov Med* 6, 40–45.

Mitsuiki, N., Schwab, C., and Grimbacher, B. (2019). What did we learn from CTLA-4 insufficiency on the human immune system? *Immunol Rev* 287, 33–49.

O

Olive, D., le Thi, S., Xerri, L., Hirsch, I., and A. Nunès, J. (2011a). Rôle de CTLA-4 dans la cosignalisation négative du système immunitaire. *Med Sci (Paris)* 27, 842–849.

P

Parry, R.V., Chemnitz, J.M., Frauwirth, K.A., Lanfranco, A.R., Braunstein, I., Kobayashi, S.V., Linsley, P.S., Thompson, C.B., and Riley, J.L. (2005). CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* 25, 9543–9553.

R

Ramgopal, S., Rathika, C., Padma, M.R., Murali, V., Arun, K., Kamaludeen, M.N., and Balakrishnan, K. (2018). Interaction of HLA-DRB1* alleles and CTLA4 (+ 49 AG) gene polymorphism in Autoimmune Thyroid Disease. *Gene* 642, 430–438.

Romo-Tena, J., Gómez-Martín, D., and Alcocer-Varela, J. (2013). CTLA-4 and autoimmunity: New insights into the dual regulator of tolerance. *Autoimmunity Reviews* 12, 1171–1176.

Rosenblum, M.D., Remedios, K.A., and Abbas, A.K. (2015a). Mechanisms of human autoimmunity. *J. Clin. Invest.* 125, 2228–2233.

Rowshanravan, B., Halliday, N., and Sansom, D.M. (2018). CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood* 131, 58–67.

Rychlik, W. (1993). Selection of Primers for Polymerase Chain Reaction. In *PCR Protocols*, (New Jersey: Humana Press), pp. 31–40.

S

Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H., and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350–1354.

Santoni, G., Amantini, C., Morelli, M.B., Tomassoni, D., Santoni, M., Marinelli, O., Nabissi, M., Cardinali, C., Paolucci, V., Torniai, M., et al. (2018). High CTLA-4 expression correlates with poor prognosis in thymoma patients. *Oncotarget* 9, 16665–16677.

Saverino, D., Simone, R., Bagnasco, M., and Pesce, G. (2010a). The soluble CTLA-4 receptor and its role in autoimmune diseases: an update. *Autoimmun Highlights* 1, 73–81.

Saverino, D., Simone, R., Bagnasco, M., and Pesce, G. (2010b). The soluble CTLA-4 receptor and its role in autoimmune diseases: an update. *Autoimmun Highlights* 1, 73–81.

Scalapino, K.J., and Daikh, D.I. (2008a). CTLA-4: a key regulatory point in the control of autoimmune disease. *Immunol. Rev.* 223, 143–155.

T

Tanhapour, M., Vaisi-Raygani, A., Khazaei, M., Rahimi, Z., Pourmotabbed, T., 1 Fertility and Infertility Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran, 2

Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran, and 3 Department of Microbiology, Immunology and Biochemistry, University of Tennessee Health Science Center, U.S.A. (2017). Cytotoxic T-lymphocyte Associated Antigen-4 (CTLA-4) Polymorphism, Cancer, and Autoimmune Diseases. *AIMS Medical Science* 4, 395–412.

Teft, W.A., Kirchhof, M.G., and Madrenas, J. (2006). A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 65–97.

TOUATI, S. Conception des amorces encadrant le SNP rs6232 du gène PCSK1 associé à l'obésité. mémoire fin d'étude. UNI VERS! TE DE TLEMCEN - ABOU-BEKR BEL KAID.

U

Uhel, F., Zafrani, L., and Commission de la recherche translationnelle de la Société de réanimation de langue française (2019). Nouvelles techniques de biologie moléculaire. *Méd. Intensive Réa.*

V

Valk, E., Rudd, C.E., and Schneider, H. (2008). CTLA-4 trafficking and surface expression. *Trends Immunol.* 29, 272–279.

Vallbracht, I., Rieber, J., Oppermann, M., Förger, F., Siebert, U., and Helmke, K. (2004). Diagnostic and clinical value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies compared with rheumatoid factor isotypes in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 63, 1079–1084.

W

Wang, N., Li, S.-Y., Yang, X.-L., Huang, H.-M., Zhang, Y.-J., Guo, H., Luo, C.-M., Miller, M., Zhu, G., Chmura, A.A., et al. (2018). Serological Evidence of Bat SARS-Related Coronavirus Infection in Humans, China. *Viol. Sin.* 33, 104–107.

Wolff, A.S.B., Mitchell, A.L., Cordell, H.J., Short, A., Skinningsrud, B., Ollier, W., Badenhop, K., Meyer, G., Falorni, A., Kampe, O., et al. (2015). CTLA-4 as a genetic determinant in autoimmune Addison's disease. *Genes Immun* 16, 430–436.

Y

Yakoub, A.M., and Schülke, S. (2019). A Model for Apoptotic-Cell-Mediated Adaptive Immune Evasion via CD80–CTLA-4 Signaling. *Front. Pharmacol.* 10, 562.

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

مقدمة: المناعة الذاتية لدى البشر هي نتيجة الفشل في التحكم في الخلايا المناعية المضادة للذات والتي تنجم عن اختلال العديد من الجزيئات الفعالة بما في ذلك CTLA-4. يخفف هذا الجزيء من تنشيط الخلايا التائية LT من خلال الارتباط في منافسة مع B7 على CD28.

أظهرت العديد من الدراسات ارتباط المورثة CTLA-4 مع مجموعة متنوعة من أمراض المناعة الذاتية. يتم إجراء هذه الدراسات بشكل رئيسي عن طريق تحليلات تفاعل البلمرة المتسلسل PCR. أثناء تطوير هذه التحليلات، يشكل اختيار البوادي خطوة حاسمة في التحليل.

الهدف: تصميم زوج من البوادي المحيطة بـ SNP ل exon 1 من جين CTLA-4 بخصوصية من أجل الشروع لاحقاً في تحليل تسلسل هذا الجين بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR.

المواد والطرق: أجرينا دراسة عن طريق المعلوماتية الحيوية والتي اشتملت على البحث عن التسلسل الجيني لجين CTLA-4 باستخدام قاعدة بيانات Ensembl ثم استخدمنا برنامج Primer blast لتصميم بادئات محددة تحيط ب exon 1 لجين CTLA-4. ثم تحليل نتائج هذا التصميم للبوادي من أجل تحديد الزوج الأكثر تناسبا.

النتائج: بعد الحصول على التسلسل الكامل للجين CTLA-4 الذي يحتوي على exons و introns واستخدام برنامج Primer-BLAST لتصميم البوادي المحددة، يتم اختيار الزوج المناسب من البوادي والذي يستجيب لدرجة حرارة تهجين تبلغ 60 درجة مئوية طول التمهيد الأمامي هو 19 نيوكليوتيد والعكسي 20 نيوكليوتيد. محتوى GC لقاعدة البادئ التمهيد هو 57٪ والبادئ العكسي 55٪. المنتج الأول سيتم تضخيمه إلى طول 508 أزواج أساسية اما بالنسبة الى المنتجات الأخرى المستبعدة؛ حيث يتم تهجين هذه المواد الأولية، تكون جميعها أكبر من 1000 نقطة أساس (وهو حجم من المستحيل تضخيمه بواسطة PCR).
الخلاصة: بفضل هذا العمل، قمنا بتطوير زوج بوادي يوظف تعدد الأشكال SNP ل exon 1 من جين CTLA-4 المرتبط بأمراض المناعة الذاتية التي تعتبر رائدة في العديد من الأمراض الخطيرة.

الكلمات المفتاحية: المناعة الذاتية، CTLA-4، LT، تعدد الأشكال، البوادي، تفاعل البلمرة المتسلسل، PCR.

Résumé

Introduction : l'auto-immunité chez l'homme est le résultat d'un échec de contrôle des cellules auto réactives qui se produit à cause de nombreux acteurs parmi lesquels le CTLA-4. Cette molécule atténue la costimulation des LT en se liant en compétition avec le B7 sur le CD28.

De nombreuses études ont montré l'association d'un polymorphisme du gène *CTLA-4* à une grande variété de maladies auto-immunes. Ces études sont principalement réalisées par des analyses PCR. Lors de la mise en point de ces analyses le choix des amorces constitue une étape cruciale.

Objectif : Concevoir avec spécificité un couple d'amorces encadrant le SNP de l'exon 1 du gène *CTLA-4* afin d'initier par la suite l'analyse de la séquence de ce gène par PCR.

Matériels et méthodes : Nous avons mené une étude bio-informatique consistant à la recherche de la séquence génomique du gène *CTLA-4* par l'utilisation de la base de données Ensembl, puis nous avons utilisé le logiciel Primer blast pour concevoir des amorces spécifiques encadrant l'exon 1 du gène *CTLA-4* et analyser, ensuite, les résultats de cette conception des amorces afin de sélectionner la paire la plus spécifiques.

Résultats : Après l'obtention de la séquence complète du gène *CTLA-4* contenant les exons et les introns et l'utilisation du logiciel Primer-BLAST pour concevoir les amorces spécifiques, la paire d'amorces adéquate est sélectionnée et qui répond à une température d'hybridation de 60°C. la longueur de l'amorce sens est de 19 nucléotides et l'amorce antisens de 20 nucléotides. La teneur en GC de l'amorce sens est de 57% et de l'amorce antisens est de 55%. Le produit qui sera amplifié à une longueur de 508 paires de bases et les autres produits, aspécifiques ; où s'hybrident ces amorces, ont tous une longueur supérieure à 1000pb (ce qui est une taille impossible à amplifier par PCR).

Conclusion : Nous avons élaboré grâce à ce travail, un couple d'amorce qui encadre le polymorphisme SNP de l'exon 1 du gène *CTLA-4* associé aux maladies auto-immunitaires qui est considéré comme préfigurant dans plusieurs maladies graves.

Mots clés : l'auto-immunité, CTLA-4, LT, polymorphisme, amorces, PCR.

Abstract

Introduction: Autoimmunity in humans is the result of a failure to control autoreactive cells that occurs due to many players including CTLA-4. This molecule attenuates the costimulation of LT by binding in competition with B7 on CD28. Numerous studies have shown the association of a CTLA-4 gene polymorphism with a wide variety of autoimmune diseases. These studies are mainly carried out by PCR analyzes. During the development of these analyzes, the choice of primers constitutes a crucial step.

Objective : Design with specificity a pair of primers surrounding the SNP of exon 1 of the CTLA-4 gene in order to subsequently initiate the analysis of the sequence of this gene by PCR.

Materials and methods : We carried out a bioinformatics study consisting in the search for the genomic sequence of the CTLA-4 gene by the use of the Ensembl database, then we used the Primer blast software to design specific primers surrounding the exon 1 of the CTLA-4 gene and then analyze the results of this design of the primers in order to select the most specific pair.

Results : After obtaining the complete sequence of the CTLA-4 gene containing the exons and introns and using the Primer-BLAST software to design the specific primers, the appropriate pair of primers is selected and which responds to a temperature of 60 ° C hybridization. The length of the forward primer is 19 nucleotides and the reverse primer is 20 nucleotides. The GC content of the sense primer is 57% and the reverse primer is 55%. The product which will be amplified to a length of 508 base pairs and the other non-specific products ; where these primers hybridize, are all greater than 1000bp in length (which is a size impossible to amplify by PCR).

Conclusion : Thanks to this work, we have developed a primer pair that frames the SNP polymorphism of exon 1 of the CTLA-4 gene associated with autoimmune diseases which is considered to be a forerunner in several serious diseases.

Keywords : Autoimmunity, CTLA-4, LT, polymorphism, primers, PCR.