



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

Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEM



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

Département Biologie

MÉMOIRE

Présenté par

Boukenadel Amel

Megnafi Hayet

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Immunologie

Thème

Analyse in silico des SNPs à conséquences fonctionnelles
sur le CTLA-4 dans le cancer colorectal

Soutenu le 29/06/2022, devant le jury composé de :

Président	Aribi Mourad	professeur	Université de Tlemcen
Encadrante	Hadjidj Zeyneb	MCB	Université de Tlemcen
Examinatrice	Djelti Farah	MCB	Université de Tlemcen

Année universitaire 2021/2022



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

Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEM



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

Département Biologie

MÉMOIRE

Présenté par

Boukenadel Amel

Megnafi Hayet

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Immunologie

Thème

Analyse in silico des SNPs à conséquences fonctionnelles
sur le CTLA-4 dans le cancer colorectal

Soutenu le 29/06/2022, devant le jury composé de :

Président	Aribi Mourad	professeur	Université de Tlemcen
Encadrante	Hadjidj Zeyneb	MCB	Université de Tlemcen
Examinatrice	Djelti Farah	MCB	Université de Tlemcen

Année universitaire 2021/2022

Dédicace

Grace à dieu tout puissant et en signe de reconnaissance à tous les sacrifices consentis pour notre réussite et la volonté pour mener à bien ce modeste travail qu'on dédie :

Aux personnes les plus chères à nos cœurs et qui ont attendu avec patience les fruits de leur bonne éducation, à nos chers parents.

A nos chers frères et sœurs qu'on admire tant pour leurs parcours de formation que pour leurs réussites professionnelles qui nous ont soutenus et encouragés.

A tous nos amis (es) qui ont toujours été là pour nous soutenir et nous booster aller de l'avant

À toutes les familles de BOUKENADEL et MEGNAFI.

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à rendre ce projet possible.

Résumé

Puisque CTLA-4 agit comme un facteur de régulation vital pour certaines réponses immunitaires, toute variation génétique dans le gène CTLA-4 peut influencer la fonction immunitaire normale et ensuite modifier le risque de cancer. Par conséquent, la recherche de l'impact de ces variations génétiques dans le gène CTLA-4 pourrait déterminer leur relation avec la susceptibilité au cancer. Pour ce faire, des outils d'analyse *in silico* de biomarqueurs a été utilisé pour étudier les polymorphismes nucléotidiques simples non synonymes délétères (nsSNP) afin de prédire les altérations dommageables et potentielles sur les propriétés de la protéine CTLA-4 et sur les protéines qui ont une relation avec CTLA-4, en particulier la protéine SRC.

Cinq outils *in silico* (SIFT, Polyphen2, PROVEAN, SNAP2, PANTHER) ont été utilisés pour estimer les SNP délétères. Ensuite les SNPs ont été soumis à l'analyse fonctionnel par les outils InterPro et PMut. Tandis que le serveur web I-Mutant3.0 a été utilisé pour déterminer les effets de la substitution des acides aminés sur la stabilité des protéines. La conservation évolutive des résidus d'acides aminés des protéines étudiés a été analysée par ConSurf.

A partir de 99 nsSNPs appartenant au CTLA-4 et 266 nsSNPs au gène SRC, 4 nsSNP de CTLA-4 et 14 pour le gène SRC ont été prédits comme étant à des mutations à haut risque.

Sur la base des résultats de cette étude, nous avons pu conclure que les substitutions délétères de la protéine CTLA-4 (T72I, N145H, N145S, T147A) et de la protéine Src (P136R, D407N, T460K, P487L, R509W, P510A, P210S, G173V, F223L, A296S, A330D, M344L, T432M, M498L) peuvent être des candidats importants pour le cancer colorectal.

Mots-clés: CTLA-4, SRC, nsSNP, cancer colorectal, analyse *in silico*.

Abstract

Since CTLA-4, acts as a vital regulatory factor for certain immune responses, any genetic variation in the CTLA-4 gene may influence normal immune function and subsequently alter cancer risk. Therefore, research into the impact of these genetic variations in the CTLA-4 gene could determine their relationship with cancer susceptibility. To this end, *in silico* biomarker analysis tools were used to study deleterious single non-synonymous nucleotide polymorphisms (nsSNPs) to predict damaging and potential alterations in the properties of the CTLA-4 protein and in proteins that have a relationship with CTLA-4, in particular the SRC protein.

Five *in silico* tools (SIFT, Polyphen2, PROVEAN, SNAP2, PANTHER) were used to estimate deleterious SNPs. Then the SNPs were subjected to functional analysis by the InterPro and PMut tools. While the I-Mutant3.0 web server was used to determine the effects of amino acid substitution on protein stability. The evolutionary conservation of amino acid residues of the studied proteins was analysed by ConSurf.

From 99 nsSNPs belonging to CTLA-4 and 266 nsSNPs belonging to the SRC gene, 4 nsSNPs of CTLA-4 and 14 for the SRC gene were predicted to be high risk mutations.

Based on the results of this study, we were able to conclude that deleterious substitutions in CTLA-4 (T72I, N145H, N145S, T147A) and Src (P136R, D407N, T460K, P487L, R509W, P510A, P210S, G173V, F223L, A296S, A330D, M344L, T432M, M498L) may be important candidates for colorectal cancer.

Keywords: CTLA-4, SRC, nsSNP, colorectal cancer, *in silico* analysis.

ملخص

نظرًا لأن CTLA-4 يعمل كعامل تنظيمي حيوي لبعض الاستجابات المناعية ، فإن أي اختلاف جيني في جين CTLA-4 يمكن أن يؤثر على الوظيفة المناعية الطبيعية وبالتالي يغير خطر الإصابة بالسرطان. لذلك ، فإن التحقق في تأثير هذه الاختلافات الجينية في جين CTLA-4 يمكن أن يحدد علاقتها بقابلية الإصابة بالسرطان. للقيام بذلك، تم استخدام أدوات تحليل المرقم الحيوي في السيليكو لدراسة الأشكال غير المترادفة الضارة للنيوكليوتيدات المفردة (nsSNPs) من أجل التنبؤ بالتغيرات الضارة والمحملة في خصائص بروتين CTLA-4 وفي البروتينات التي لها علاقة بـ CTLA-4 ، ولا سيما بروتين SRC.

تم استخدام خمسة أدوات في السيليكو (SIFT و Polyphen2 و PROVEAN و SNAP2 و PANTHER) لتقدير تعدد الأشكال الضارة. ثم خضعت SNPs لتحليل وظيفي بواسطة أدوات PMut و InterPro. بينما تم استخدام خادم الويب I-Mutant3.0 لتحديد تأثيرات استبدال الأحماض الأمينية على استقرار البروتين. تم تحليل الحفظ التطوري لبقايا الأحماض الأمينية للبروتينات المدروسة بواسطة ConSurf.

من 99 nsSNPs التي تنتمي إلى CTLA-4 و 266 nsSNP إلى جين SRC، تم توقع أن تكون 4 nsSNPs من CTLA-4 و 4 و 14 لجين SRC طفرات عالية الخطورة.

بناءً على نتائج هذه الدراسة، تمكنا من استنتاج أن البدائل الضارة لبروتين (T72I) CTLA-4 ،N145S ،N145H ،T147A) و بروتين (P136R Src ،D407N ،T460K ،P487L ،R509W ،P510A ،P210S ،G173V ،F223L ،A296S ،A330D ،M344L ،T432M ،M498L) قد تكون مرشحة مهمة لسرطان القولون والمستقيم.

الكلمات المفتاحية: CTLA-4 ، SRC ، nsSNP ، سرطان القولون والمستقيم، تحليل السيليكو.

Remerciements

Au début de cette thèse, nous voudrions d'abord remercier **ALLAH**, qui nous a donné la force et la patience de faire ce modeste travail, et qui nous a guidé sur le bon chemin.

Un grand merci à notre encadrante **Dr. HADJIDJ Zeyneb**, d'avoir dirigé nos travaux avec disponibilité sans faille, une infinie bienveillance, pour sa profonde gentillesse et ces précieux conseils.

Noud remercions **Mr. Mourad ARIBI**, Directeur du Laboratoire BIOMOLIM, UABT (Faculté SNV/STU) de nous avoir permis de travailler dans Laboratoire BIOMOLIM.

Nous voudrions remercier les membres de notre jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail et de nous avoir consacré du temps, en l'occurrence **Pr. Mourad ARIBI**, et **Dr. Djelti Farah** (université de Tlemcen).

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Taux d'incidence normalisés selon l'âge (dans le monde) du CCR cher les deux sexes.....	6
Figure 1.2 : Progression du CCR.....	7
Figure 1.3 : Les différents stades du cancer du colorectal.....	8
Figure 1.4 L'évolution d'immunosurveillance et l'installation d'un cancer.....	11
Figure 1.5 . Localisation du gène CTLA-4 sur le chromosome 2 humain.....	14
Figure 1.6 : Structure du CTLA-4.....	15
Figure 1.7 : Fonction de CTLA-4.....	16
Figure 1.8 : Voies de signalisation du CTLA-4.....	18
Figure 1.9 : structure de Src.....	19
Figure 2.1 : study design	26
Figure 2.2 : Base de données NCBI dbSNP.....	27
Figure 2.3 : UniProtKB.....	28
Figure 2.4 : logiciel SIFT.....	29
Figure 2.5 : Logiciel PolyPhene v2.....	30
Figure 2.6 : PROVEAN	30
Figure 2.7 : logiciel SNAP2.....	31
Figure 2.8 : PANTHER.....	31
Figure 2.9 : l'outil InterPro.....	32
Figure 2.10 : PMUT.....	33
Figure 2.11 : I-Mutant 3.0.....	34
Figure 2.12 : Le serveur web ConSurf.....	34
Figure 3.1 Distribution des nsSNPs dans le gène CTLA-4 basée sur les effets estimés prédits par divers outils fonctionnels.....	41
Figure 3.2 Distribution des nsSNPs dans le gène SRC basée sur les effets estimés prédits par divers outils fonctionnels.....	42
Figure 3.3 : Domaine fonctionnel de CTLA-4.....	43
Figure 3.4 : Les domaines fonctionnels de SRC.....	44
Figure 3.7 :Distribution des nsSNPs dans le gène SRC basée sur les effets estimés prédits par divers outils structurels.....	45
Figure 3.8 :Distribution des nsSNPs dans le gène CTLA-4 basée sur les effets estimés prédits par divers outils structurels.....	46
Figure 3.5 : Conservation évolutive de CTLA-4 générée par le serveur web Consurf.....	49
Figure 3.6 : Conservation évolutive de SRC générée par le serveur web Consurf.....	49
Figure 3.9 : Analyse <i>in silico</i> des SNPs fonctionnelles sur CTLA- et SRC	50

LISTE DES TABLEAUX :

Tableau 1.1 Les différents types d'antigènes tumoraux.....	13
Tableau 3.1 :Liste des résultats de l'analyse des nsSNPs CTLA-4 par cinqprogrammes <i>in silico</i>	37
Tableau 3.2 : Liste des résultats de l'analyse des nsSNPs SRC par cinq programmes <i>in silico</i> ..	38
Tableau 3.3 : Position des nsSNPs sur les domaines de SRC.....	43
Tableau 3.4 : Prédiction des nsSNP dans les protéines CTLA-4 et SRCpar PMut, I-Mutant 3.0 et ConSurf.....	47

LISTE DES ABREVIATIONS

AA : acides aminés
AC : Anticorps.
ACE : antigène carcino-embryonnaire.
dbSNP : base de données Single Nucleotide Polymorphism
(Cbl)-b Protéine Casitas-B-lineage lymphoma.
CCR : cancer colorectal.
CD : Cluster de Différenciation.
CDK : cyclin dépendante de kinase.
CDR : complementarity-determining region.
CIN : chromosome instability (instabilité des chromosomes).
CPA : cellules présentatrices d'antigènes.
CTLA-4 : antigène cytotoxique des lymphocytes T-4.
ERK: extracellular signal-regulated kinase
IDO: indoleamine-2, 3-dioxygenase,
ITAM: Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs.
Htert: **protéine** human telomerase reverse transcriptase
JNK: c-JUN N-terminal kinase.
LAT: Linker Activated T cells.
MAGE-3: **melanoma**-associated antigen 3.
MDSC: myeloïd-derived suppressor cells.
MUC-1: mucin 1.
mTOR: mammalian target of rapamycin.
NCBI:National Center for Biotechnology Information
NF-κB: nuclear factor-kappa B.
nsSNP:polymorphisme nucléotidique non synonyme
NY-ESO-1: New York esophageal squamous cell carcinoma 1.
PAF : polypose adénomateuse familiale.
PANTHER:Protein Analysis Through Evolutionary Relationship.
PCB : polychlorobiphényles.
PKB: protéine kinase B.
PolyPhen v2: Polymorphism Phenotyping v2.
PROVEAN: Protein Variation Effect Analyzer.
PP2A: serine/threonine phosphatase 2A.
rs: Rapport SNP.
SIFT: Sorting Intolerant from Tolerant
SNP: polymorphisme mononucléotide.
SNAP2: Screening of Non-Acceptable Polymorphism 2
SYK: Spleen tyrosine kinase.
SRC: Sarcoma
TGFβ: transforming growth factor.
TNM: Tumor, Nodes, Metastasis.
VH : chaîne lourde.
VL : chaîne légère.
ZAP-70 : protéine zêta-associée de 70kDa.

TABLE DE MATIERE

Dédicace	
Resumé.....	iv
Abstract	v
Remerciements.....	vii
Liste des figure.....	viii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des abréviations.....	x
Introduction.....	2
I. Chapitre I : Revue de la littérature.....	4
1.1 Cancer colorectal	5
1.1.1. Généralité.....	5
1.1.2. Epidémiologie.....	5
1.1.3. Facteur de risque	6
1.1.3.1 L'âge.....	6
1.1.3.2 Habitudes de vie.....	6
1.1.3.3 L'exposition à des polluants et à des substances chimiques.....	6
1.1.3.4 Facteurs individuels	6
1.1.3.5 Facteurs familiaux et génétiques.....	6
1.1.4 Evolution du cancer colorectal.....	7
1.1.4.1 Carcinogénèse Colorectale.....	7
1.1.4.2 Stades du cancer colorectal.....	8
1.1.5 Symptômes du cancer colorectal.....	9
1.1.6 Diagnostic du cancer colorectal	9
1.1.7 Traitements.....	10
1.1.7.1 Chirurgie.....	10
1.1.7.2 Radiothérapie.....	10
1.1.7.3 Chimiothérapie	10
1.1.7.4 Thérapies ciblées.....	10
1.1.7.5 Immunothérapie	11
1.2. Immunosurveillance	11
1.2.1 Concept d'immuno-editing.....	11
1.2.2 Réponse immunitaire dans les cancers colorectaux.....	12
1.2.3 Immunosuppression dans les cancers colorectaux.....	13
1.3. CTLA-4.....	14
1.3.1. Gène CTLA-4.....	14
1.3.2. Structure de CTLA-4.....	15
1.3.3. Expression de CTLA-4.....	15
1.3.4. Rôle de CTLA-4.....	16
1.3.5. Signalisation CTLA-4 dans le cancer colorectal	17
1.3.6. Polymorphisme de gène CTLA-4 et cancer colorectal.....	18
1.3.7. Ciblage de CTLA-4 dans l'immunothérapie du cancer.....	18
1.4 Proto-oncogène tyrosine-protein kinase Src.....	19
1.4.1 Implication du gène SRC dans le cancer colorectal.....	19
1.4.2 Structure de SRC.....	19
1.4.3 Relation entre CTLA-4 et SRC.....	20
1.4.4 Mutation responsable du cancer colorectal.....	20
1.5. Polymorphisme nucléotidique	20
1.5.1 Origine des polymorphismes nucléotidique.....	20
1.5.2 Classification des polymorphismes nucléotidiques.....	21

1.5.3 Avantages et inconvénients des polymorphismes nucléotidiques.....	22
1.5.4 Application des polymorphismes nucléotidiques.....	22
1.5.5 Rôle des polymorphismes nucléotidiques dans le traitement du cancer colorectal.....	23
1.6. Analyse <i>in silico</i> des polymorphismes nucléotidiques.....	23
1.6.1 Définition d'analyse <i>in silico</i>	23
1.6.2 Intérêt de l'analyse <i>in silico</i> des polymorphismes nucléotidiques.....	23
1.7.1. Problématique.....	24
1.7.2 Objectif	24
1.7.3 But.....	24
II. Chapitre II : Matériel et méthodes.....	26
2.1 Exploration de données.....	27
2.2 Prédiction des nsSNP délétères par différents outils de bioinformatique.....	28
2.3 Identification de divers domaines dans CTLA-4 ET Src et le triage des effets des SNP sur ces domaines.....	32
2.4 Validation des nsSNP à haut risque	32
2.5 Analyse de l'effet des nsSNPs sur la stabilité des protéines.....	33
2.6 Prédiction de la conservation évolutive.....	34
III. Chapitre III : Résultats et interprétation.....	36
3.1 Récupération des nsSNP dans les gènes CTLA-4 et SRC.....	36
3.2 Prédiction des nsSNP délétères.....	36
3.3 Identification des domaines des protéines CTLA-4 et Src et catégorisation des nsSNPs dans ces domaines.....	42
3.4 Vérification des nsSNP à haut risque par PMut.....	44
3.5 Détermination de la stabilité des protéines.....	44
3.4 Analyse de la conservation évolutive des protéines.....	45
IV. Chapitre IV :Discussion.....	53
V. Chapitre V : Conclusion et perspectives	56
VI. Chapitre VI : bibliographie.....	58
Annexe 01 : Prédiction des nsSNP dans les protéines CTLA-4 par des outils bioinformatiques.....	68
Annexe 02 : Prédiction des nsSNP dans les protéines SRC par des outils bioinformatiques.....	74

INTRODUCTION

Introduction :

Le cancer colorectal (CCR) est une tumeur maligne de la muqueuse (paroi interne) du côlon ou du rectum. Il résulte de l'accumulation progressive de multiples aberrations génétiques et épigénétiques au sein des cellules (Nguyen et Duong, 2018). Le CCR est le deuxième cancer le plus fréquent chez les femmes et le troisième chez les hommes dans le monde (Tariq et Ghias, 2016).

Le problème qui empêche la détection du cancer colorectal c'est l'absence des symptômes, même lorsqu'ils sont présents ils ont tendance à être non spécifiques et non significatifs. Ceci provoque un retard de diagnostic de la maladie et, réduit les chances de traitement (Loubna Allam, 2020).

La tumeur est capable de bloquer la réaction antitumorale par l'inhibition de l'activité lymphocytaire via le système de régulation "checkpoint", et grâce à de l'immunothérapie les lymphocytes peuvent récupérer leur capacité d'éliminer les cellules néoplasique grâce aux molécules inhibitrices Anti -CTLA4, Anti PD-L1 et Anti PD-1 (S.Paul et al, 2016).

CTLA4 (antigène cytotoxique des lymphocytes T-4) est une molécule de Cosignalisation qui appartient à la superfamille des immunoglobulines, associées à la surface des lymphocytes T conventionnelles activés, aussi les lymphocytes Treg et d'autres cellules immuns. Elle agit comme un facteur de régulation vital pour certaines réponses immunitaires, toute variation génétique du gène CTLA-4 peut influencer la fonction immunitaire normale et ensuite modifier le risque de cancer (Chen Zou, et al, 2018). D'autre part, elle joue un rôle thérapeutique important par la stratégie « inhibition des inhibiteurs » utilisée en particulier en cancérologie (Med Sci, 2011).

Le polymorphisme nucléotidique (SNP) est une variation dans un nucléotide unique qui se produit à un point spécifique dans le génome. Ce nucléotide unique peut être modifié (substitution), supprimé (délétion) ou ajouté (insertion) à une séquence polynucléotidique (Amal Ahmed Abd El-Fattah, 2018). Les SNP ont été proposés comme une nouvelle génération de marqueurs pour l'identification de loci associés à des maladies complexes telles que le cancer colorectal et pour des applications pharmacogénétiques. Dans la mesure où ces études sont réussies, elles devraient influencer profondément notre compréhension des maladies, les méthodes de diagnostic et, finalement, la mise au point de nouvelles thérapies plus efficaces (Loubna ALLAM, 2020).

Les SNP peuvent affecter les codons des acides aminés situés dans le domaine actif de la fourche de la protéine ou d'autres sites et peuvent gravement affecter la fonction des facteurs de transcription. En outre, les SNP sont réalisables et rentables pour étudier en utilisant l'analyse *in silico* via les outils bio-informatiques disponibles (Mohammed Nimir et al, 2017).

L'intérêt croissant pour la compréhension de la relation entre la variation des séquences génétiques et ses effets sur la structure et la fonction d'une protéine ont conduit plusieurs méthodes *in silico*. Les techniques expérimentales pour identifier l'effet de multiples nsSNP (polymorphisme nucléotidique non synonyme) sont très coûteuses, laborieuses, et impliquent beaucoup de temps, et donc, les approches *in silico* peuvent être utilisées comme outils préalables pour analyser l'effet des nsSNP (Harini Venkata Subbiah et al, 2020) qui pourraient affecter des cibles médicamenteuses importantes avant une étude plus approfondie par des techniques de laboratoire (James T.L. Mah, Esther S.H. Low and Edmund Lee, 2011).

Dans notre étude, nous effectuons une analyse *in silico* des polymorphismes nucléotidiques unique (SNP) ayant des conséquences fonctionnelles sur le CTLA-4 dans le cancer colorectal, afin de les identifier *in silico* et les proposer à des tests de confirmation *in vitro* et *in vivo* et explorer de nouvelles perspectives dans le diagnostic et le traitement du CRC (**Hassan Dana et al, 2020**).

CHAPITRE I :
REVUE
DE LA
LITTERATURE

I. REVUE DE LA LITTERATURE

1.1 Cancer colorectal :

1.1.1 Généralités :

Les CCRs se forment dans le colon ou la dernière partie du gros intestin 'le rectum'. Ils surviennent dans la majorité des cas (96%) au niveau des glandes de la muqueuse intestinale ; ce sont des cancers glandulaires ou dits « adénocarcinomes » (**Elodie GUILLEMOT, 2013**).

Dans le CCR les hommes sont plus touchés que les femmes avec une moyenne d'âge, au diagnostic, entre 65 et 70 ans (**ABES Fatiha, ADJAOUTI Zahia, BELAIDI Melissa, 2015**).

À un stade précoce, et dans 20 % des cas, le CCR est asymptomatique et détecté au stade métastatique. La détection et le traitement précoces du CCR réduisent le risque de mortalité (**Pietge, H, et al, 2017**).

Le CCR peut être héréditaire, familiale ou sporadique. Le CCR héréditaire représente entre 10 et 25 % et dérive des mutations de la ligne germinale, alors que le CCR sporadique représente environ 70% et dérive des mutations somatique (**Cherfaoui khaled, 2017**).

1.1.2. Epidémiologie

A) Dans le monde :

Dans le monde, le cancer colorectal est classé parmi les cancers les plus fréquents (3ème rang après le cancer du sein et celui de la prostate) (**Boyle, P, Langman JS, 2000**). Il représente 9,4% de tous les cas de cancer chez les hommes et 10,1% chez les femmes (**Belhamidi et al, 2018**).

Le cancer colorectal est un cancer des pays riches : Il est fréquent en Amérique du Nord, en Australie, en Nouvelle Zélande, en Europe occidentale et au Japon. Il est rare en Amérique du Sud, en Asie et en Afrique. L'incidence tend à être basse en Afrique et en Asie et intermédiaire dans les parties sud de l'Amérique. Ces différences géographiques importantes pour les CCR peuvent être expliquées par des expositions environnementales différentes (**Jacques Ferlay, et al, 2012**).

B) En Algérie :

En Algérie, les CCRs sont devenus les premiers cancers digestifs chez les deux sexes. Selon l'Institut National de Santé Publique en 2010, son incidence est estimée à 14cas/100000 habitants chez l'homme et 13,8 cas/100000 habitants chez la femme. L'incidence du CCR en Algérie a connu une ascension fulgurante ces dernières décennies, même si elle demeure faible par rapport à celle des pays développés (**Abderrahmane, et al 2015**).

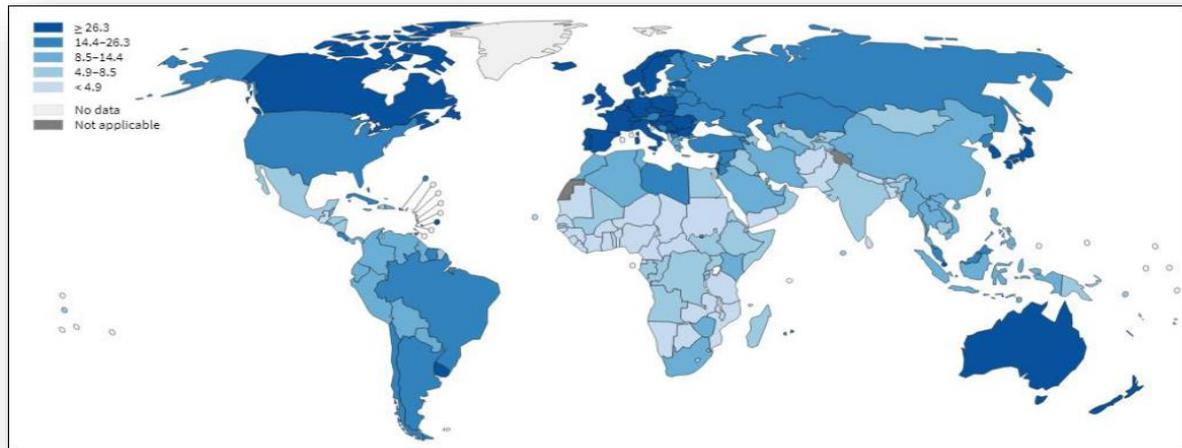


Figure I.1 : taux d'incidence normalisés selon l'âge (dans le monde) du CCR chez les deux sexes (GLOBOCAN, 2012).

1.1.3 Facteurs de risque :

Le CCR est un processus multifactoriel, impliquant plusieurs facteurs de risque :

1.1.3.1 Age :

C'est le facteur de risque majeur, il peut apparaître à partir de l'âge des 50 ans et rarement avant 40 ans. Avant 50 ans, les taux d'incidence sont faibles et proches entre les deux sexes puis augmentent avec l'âge, plus rapidement chez l'homme que chez la femme (Howard R.A et al, 2008).

1.1.3.2 Habitudes alimentaires :

Tels que l'alimentation trop riche en graisse animale, viande rouge et pauvre en fibres, le Tabac, l'alcool ainsi que la sédentarité et le surpoids (Svrcek, M, et al, 2011). D'autre part, la consommation du lait, les fruits, les légumes, les produits céréaliers complets et les fibres diminuent le risque de développer un CCR (Lafay L et al, 2016).

1.1.3.3 Exposition aux polluants et substances chimiques :

Le risque du CCR augmente par l'exposition à l'amiante, les rayonnements ionisants (association des éléments de traces et le cancer colorectal chez le sujet algérien) et certains polluants qui se trouvent au niveau des aliments en particulier les pesticides et les polychlorobiphényles (PCB) (Michel Ducreux, 2021).

1.1.3.4 : Les facteurs individuels :

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin comme la maladie de Crohn augmentent le risque du CCR, il y a des études qui montrent que les femmes atteintes du cancer du sein, ou d'ovaire être touchées par un nouveau cancer au niveau du côlon ou du rectum (Michel Ducreux, 2021)

1.1.3.5 : Les facteurs familiaux et génétiques :

Le CCR est lié à des prédispositions génétiques, les personnes qui ont des mutations au niveau des gènes de la famille MMR notamment MSH2, MLH1, MSH6 ont un risque de développer un CCR avant l'âge des 70 ans avec un pourcentage de 40 à 70 % (Pascal Pujol, 2018).

Les sujets appartenant à une famille présentant des polyposes adénomateuses familiales (PAF), des cancers à transmission héréditaire ou des cancers héréditaires sans polypose (Syndrome de Lynch) sont les sujets qui ont la capacité de développer un CCR (Parente, 2010).

1.1.4 Evolution du cancer colorectal

1.1.4.1 La Carcinogénèse Colorectale :

Le CCR se développe à travers une série d'évènements qui mènent à la transformation de la muqueuse normale en adénome puis au carcinome (JASS, 2000). Ceci correspond à l'accumulation progressive des mutations au sein des cellules épithéliales coliques et l'activation d'oncogènes et/ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (Fearon E.R., Vogelstein B, 1990).

La carcinogénèse colorectale est maintenant bien connue à chaque étape de la transformation maligne : cryptes aberrantes, adénome, dysplasie, cancer et métastases (Fearon E.R, Vogelstein B, 1990).

Il existe trois principales voies de cancérognèse colorectale (Liviere A et al, 2004) :

- L'instabilité chromosomique,
- L'instabilité microsatellitaire
- L'hyperméthylation des îlots CpG.

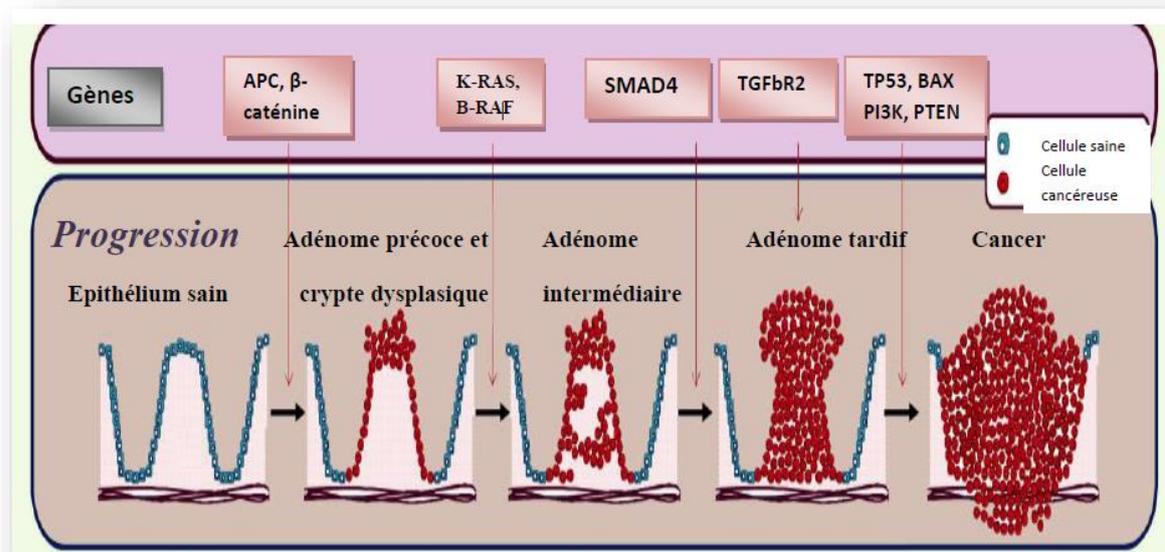


Figure I.2 : Progression du CCR (Olivier et al, 2011).

1.1.4.2 Stades du cancer colorectal

Les stades du cancer sont définis selon la classification TNM « Tumor, Nodes, Metastasis » par trois critères essentiels qui sont les suivants (L - J. Lamrani., 2008) :

- Taille et profondeur de la tumeur
- Atteinte ou non des ganglions lymphatiques et le nombre des ganglions lymphatiques atteints
- Présence ou non de métastase

Afin de trouver le traitement le plus adapté, il est important de savoir jusqu'où la tumeur s'est propagée. Pour ce faire, on distingue plusieurs stades (Esch, A et al, 2012) :

- **Stade 0** : la tumeur est in situ, ce qui signifie que la tumeur touche uniquement la couche de muqueuse de la paroi intestinale
- **Stade I** : la tumeur envahit la deuxième couche (sous-muqueuse) ou la couche musculaire (muscleuse) de la paroi du côlon ou du rectum, sans métastase ganglionnaire.
- **Stade II** : la tumeur a traversé la paroi et a envahi les organes avoisinants sans avoir touché d'autres organes.
- **Stade III** : la tumeur a atteint les ganglions avoisinants, mais sans atteindre les organes éloignés.
- **Stade IV** : la tumeur correspond à une évolution métastatique et s'est propagée à des endroits éloignés, généralement le foie ou les poumons.

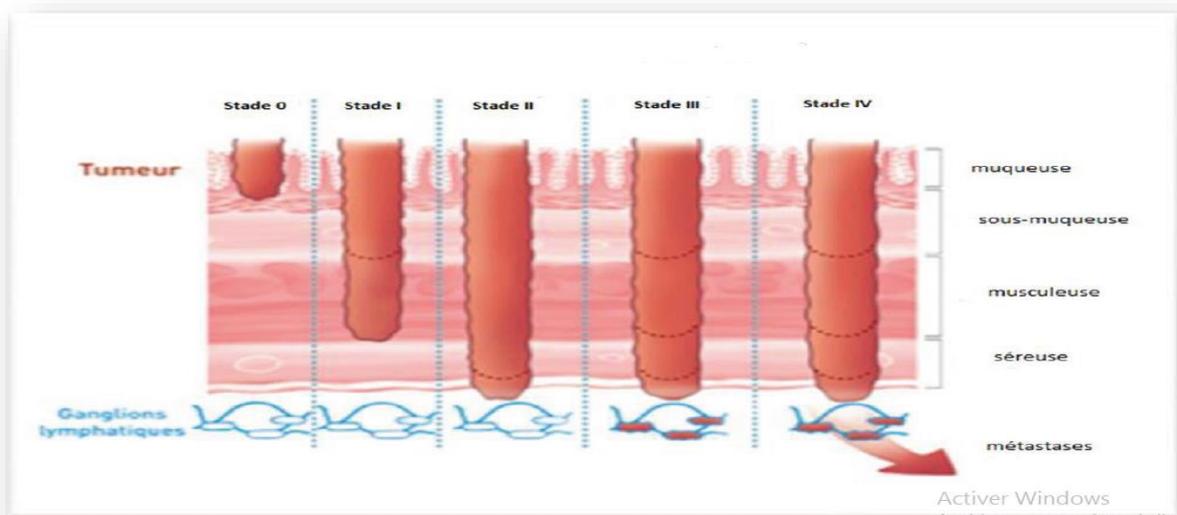


Figure I.3 : Les différents stades du cancer du colorectal (Institut National Du Cancer ,2010).

1.1.5 Symptômes du cancer colorectal :

Dans les premiers stades du cancer colorectal, les signes et les symptômes peuvent-être illisible, ils apparaissent au fur et à mesure lorsque la tumeur se développe dans les tissus et les organes voisins. On retrouve parmi ces symptômes (**Faivre, J., Lepage, C., & Viguier, J, 2009**) :

- ✓ La présence de sang dans les selles avec une coloration noir ou rouge vif.
- ✓ Une perte de poids de façon anormal.
- ✓ Une sensation de très grande fatigue.
- ✓ Des douleurs ou des malaises abdominaux tels que le ballonnement.
- ✓ Des diarrhées ou des constipations.
- ✓ Faiblesse.
- ✓ Perte d'appétit.
- ✓ Occlusion intestinale.
- ✓ Troubles respiratoires.
- ✓ Anémie.

1.1.6 Diagnostic du cancer colorectal :

L'objectif principal de l'évaluation clinique du CCR est de détecter une éventuelle extension métastatique et d'évaluer l'opérabilité de la tumeur et du patient (**Daly-schweitzer N et al, 2003**).

Le diagnostic du CCR est fondé cliniquement par le toucher rectal qui détermine si la tumeur est suffisamment basse et la rectosigmoïdoscopie ou la coloscopie qui permet sa visualisation et, en même temps, le prélèvement biopsique afin de s'assurer de l'absence d'autres lésions sur le reste du côlon. Avant sa confirmation par coloscopie, le diagnostic peut être évoqué par d'autres examens morphologiques (lavement baryté, scanographie abdomino-pelvienne, coloscopie virtuelle, coloscanner) (**Dr. Hassaine mohamed Said en 2012**).

Grâce à la mise en place de nouvelles techniques de diagnostic telles que la colonographie par tomodensitométrie, l'analyse de l'ADN des selles et la vidéo-coloscopie sans fil, les patients pourront à l'avenir être dépistés avec un minimum de perturbation et pourront même être dépistés à domicile ou au travail. Dans un avenir prévisible, cependant, ces méthodes ne remplaceront pas la coloscopie classique pour distinguer les vrais et les faux résultats positifs de la pathologie obtenus par d'autres méthodes de dépistage. Ces nouvelles méthodes ne permettent pas non plus de dépasser les difficultés liées au dépistage (**Alan Barkun et al, 2007**).

1.1.7. Traitement du cancer colorectal :

Il existe différentes méthodes de traitement du CCR, mais le Choix du traitement dépend du stade et de localisation du cancer et de l'état général du patient.

1.1.7.1 La chirurgie :

C'est le traitement principal du CCR qui consiste à retirer la partie du côlon où se trouve le cancer. Une chirurgie d'exérèse peut être proposée dans les cas où on a des métastases hépatiques ou pulmonaires et si leur taille et leur nombre sont limités, soit secondairement après une réduction par la chimiothérapie (**Cady B, Stone M, 1991**).

1.1.7.2 La radiothérapie :

Le principe de ce traitement est de réduire le volume de la tumeur à partir des doses de rayons énergétiques réalisées par des séances courtes durant 05 jours par semaine pendant 05 semaines en quelques minutes, et se termine avec une intervention chirurgicale après la sixième semaine du traitement. Ce traitement est capable de tuer les cellules cancéreuses. Généralement on n'utilise pas la radiothérapie dans le cancer du côlon, sauf si la tumeur n'est pas enlevée de façon complète à cause d'un envahissement important (**Michel Ducreux. 2014**).

1.1.7.3 La chimiothérapie :

Pour détruire les cellules cancéreuses et réduire les risques de récurrence on utilise la chimiothérapie par l'administration d'une ou plusieurs molécules, dite adjuvant si elle est complémentaire à la chirurgie. Il existe différents protocoles selon l'existence ou l'absence de métastases. La chimiothérapie de référence actuelle associée 5FU (5-fluoro-uracil) avec l'acide folinique et l'oxaliplatine ou « FOLFOX » en cure de 2 jours tous les 15 jours pendant 6 mois (**Jesus Cardenas, 2016**).

1.1.7.4 Les thérapies ciblées :

Ce sont des médicaments anticancéreux ciblant des molécules spécifiques qui peuvent être des récepteurs, des gènes ou des protéines impliqués dans la cancérogènes. Ces thérapies appartiennent à deux grandes classes pharmacologiques qui sont les AC monoclonaux et les inhibiteurs de tyrosine kinases et d'autres inhibiteurs des voies PI3k, Akt et mTOR (**Thomas Walter et al, 2016**).

1.1.7.5 : Immunothérapie :

Afin de restaurer la capacité des lymphocytes à attaquer les cellules tumorales, l'immunothérapie joue un rôle très important par son intervention par des molécules inhibitrices appelées inhibiteurs de points de contrôle, principalement : Ac anti-CTLA4, Ac anti-PD-L1 et Ac anti-PD-1. Ces approches thérapeutiques permettent la restauration des fonctions du système immunitaire (S. Paul et al, 2016).

1.2. Immunosurveillance

1.2.1 Concept d'immunoediting :

L'immuno-édition est définie par la sélection des variantes non immunogènes des cellules tumorales (Zitvogel et al, 2006), elle est connue sous le nom de théorie des 3E. L'interaction entre la tumeur et le système immunitaire comporte 03 phases :

La phase d'élimination est une phase cellulaire dans laquelle le système immunitaire détecte la présence des cellules tumorales et les élimine par la suite. Lorsqu'elles ne sont pas éliminées, le système immunitaire entre dans une phase d'équilibre pendant laquelle le système immunitaire exerce une pression sélective sur les cellules tumorales et favorise l'émergence de clones faiblement immunogènes (Dr Stéphane Champaint, 2016). Cette phase est suivie par une phase d'échappement, durant laquelle les cellules tumorales développent la capacité de détourner la reconnaissance et/ou la destruction par le système immunitaire. Cela aboutit au développement d'une tumeur cliniquement présente qui peut être détectée et prise en charge (François Ghiringhelli, 2013).

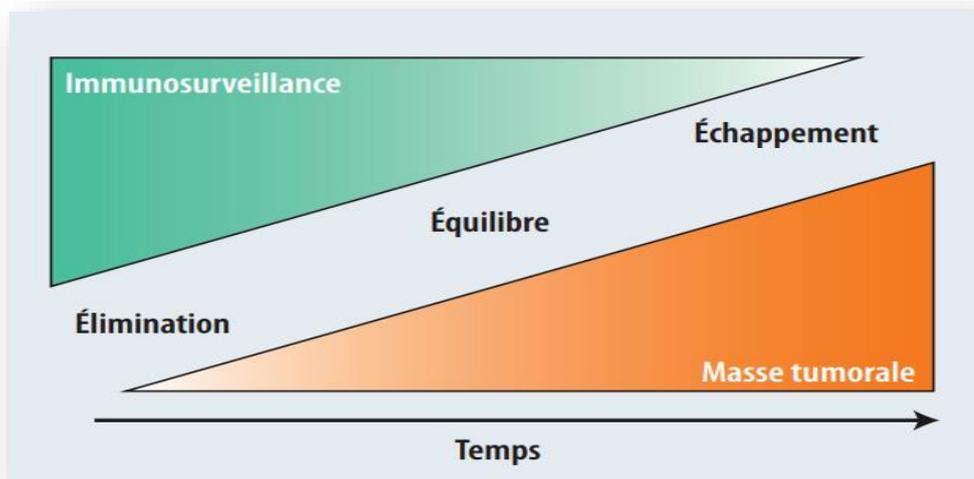


Figure 1.4 : L'évolution d'immunosurveillance et l'installation d'un cancer (Zitvogel L, Galluzzi L, Smyth MJ, Kroemer G, 2013).

1.2.2 La réponse immunitaire dans les cancers colorectaux :

Plusieurs arguments montrent l'importance du rôle du système immunitaire dans le contrôle du développement des CCRs (**Tougeron D et al, 2013**).

- La description de nombreux antigènes tumoraux pouvant induire une réponse immunitaire ;
- La détection d'une réponse immunitaire altérée dans le CCR ;
- La corrélation entre l'infiltration lymphocytaire et le pronostic.

1.2.2.1 Antigènes tumoraux exprimés dans les cancers colorectaux :

A) L'antigène carcino-embryonnaire (ACE) :

ACE est l'antigène le plus étudié et le plus caractéristique des CCRs. Il est principalement présent pendant la vie embryonnaire, mais largement surexprimé dans la plupart des CCRs (**Keogh E et al, 2001**). Des études antérieures ont identifié des anticorps spécifiques anti-ACE et des LT dirigés contre l'ACE dans le sang circulant des patients atteints de CCR et leur corrélation avec le pronostic. En effet, l'ACE pourrait également avoir un rôle immunomodulateur négatif en inhibant le déclenchement d'une réponse T cytotoxique spécifique (**Keogh E et al, 2001**).

B) Autres antigènes impliqués dans les cancers colorectaux :

Le gène onco-suppresseur TP53, surexprimé dans les CCR, pourrait être la cible d'une réponse immunitaire efficace, mais ne semble pas corrélée à d'autres protéines exprimées dans les CCR telles que la protéine kinase p56lck, la protéine human télomérase reverse transcriptase (hTERT), mucin 1 (MUC-1) et la survivine qui pourraient être immunogènes (**van der Burg SH, et al. 2001**).

Des cancers testis antigènes ont également été identifiés dans les CCR. La protéine melanoma-associated antigen 3 (MAGE-3), de fonction inconnue, est exprimée dans 20 à 60 % des tumeurs épithéliales, dont les CCR. Elle a été décrite pour la première fois dans les mélanomes et une réponse cytotoxique spécifique a été mise en évidence. La protéine New York esophageal squamous cell 1 (NY-ESO-1) présente dans environ 10 % des CCR semble également être immunogène (**Keogh E et al, 2001**).

Dans les CCRs, il existe également des néo-antigènes résultant de mutations. La présence de mutations au codon 12 ou 13 du proto-oncogène KRAS pourrait être immunogène. Les formes

mutées de TP53 pourraient également être la cible d'une réponse immunitaire efficace (Tougeron D, Fauquembergue É, Latouche JB 2013).

Type d'antigène tumoral	Mécanisme	Expression	Exemple dans le CCR
Ag normaux surexprimés	Exprimés dans certains tissus et surexprimés dans certains type de tumeurs	Ubiquitaire	Embryonnaires ACE Non embryonnaires Her-2/Neu Ep-CAM p56 ^{lck} surviving MUC-1
Ag de différenciation <i>Cancer testis Ag</i>	Modulation de l'expression dans certains types de tumeurs Non exprimés dans les cellules normales (en dehors des cellules germinales) et « dérprimés » dans certaines tumeurs	Dans certains types histologiques Spécifiques d'un type tumoral	- MAGE-3 NY-ESO-1
Néo-antigènes	Générés par des mutations	Spécifiques d'une tumeur	TP53 KRAS TGFβR2
Ag viraux	Dans les tumeurs viro-induites	Spécifiques d'un type tumoral	-

Tableau 1.1 Les différents types d'antigènes tumoraux

1.2.3 Immunosuppression dans les cancers colorectaux

Le CCR peut échapper à la réponse immunitaire par divers mécanismes :

- La perte d'expression du CMH de classe I (Browning M et al, 1996).
- La dérégulation de la présentation antigénique (Browning M et al, 1996).
- Une augmentation de l'expression de molécules immuno-inhibitrices (Markman et Shiao 2015).
- Les cellules tumorales colorectales sécrètent des facteurs immunosuppresseurs tels que le TGF-β et favorisent le recrutement de Tregs et MDSCs (Massagué 2008).
- Une polarisation des cellules T en Th2 qui conduit à la production des agents immunosuppresseurs est fréquemment observée dans le dans le microenvironnement du CCR (Massagué 2008).
- Les cellules tumorales développent des mécanismes de résistance à la lyse, notamment par la perte de l'expression membranaire de Fas. Parallèlement, les cellules cancéreuses expriment le Fas Ligand (FasL) et sont capables d'induire l'apoptose des lymphocytes T qui expriment Fas (Emambux et al. 2018).

1.3 CTLA4 :

Le CTLA-4 est une molécule inhibitrice exprimée par un lymphocyte T activé. Elle se lie au B7-1 (CD 80) et au B7-2 (CD 86) exprimés sur les membranes des cellules présentatrices d'antigènes. Elle joue un rôle dans la régulation négative de la réactivité des lymphocytes T, la libération de CTLA-4 sera tout de suite après l'activation des lymphocytes T. Chez l'homme, certains polymorphismes du gène qui modifient les taux ou la fonction du CTLA-4, conduisent à l'augmentation de la susceptibilité au CCR et certaines maladies auto-immunes (**Scheipers P et al, 1998**).

1.3.1 Gène CTLA-4 :

Le gène CTLA-4 est situé sur le chromosome 2q33. Il est constitué de 4 exons et 3 introns. Il est caractérisé par une taille de 6,175 bases aussi, il code pour une protéine de 223 acides aminés ayant un poids moléculaire de 24656 Da, ce gène est composé par : un domaine de la liaison au ligand codé par l'exon 1, un domaine de type immunoglobuline codé par l'exon 2, un domaine transmembranaire codé par l'exon 3 et une queue cytoplasmique codée par l'exon 4 (**Brunet et al, 1987**).

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

Le gène contient 4 exons : l'exon 1 code pour le peptide signal, l'exon 2 code pour le domaine extracellulaire qui contient 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**).

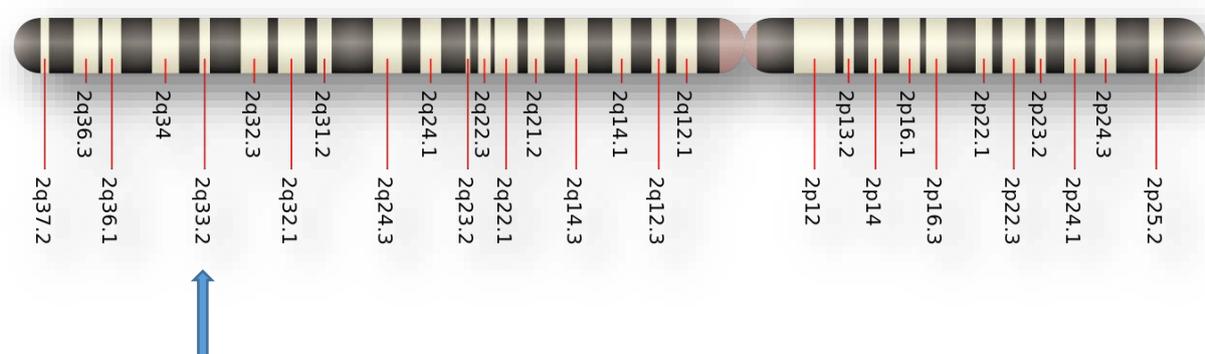


Figure 1.5. Localisation du gène CTLA-4 sur le chromosome 2 humain

1.3.2 Structure du CTLA-4

CTLA-4 est une molécule qui appartient à la super famille des immunoglobulines contient un domaine V extracellulaire, un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique (**Lee et al. 2019**).

Elle est constituée de deux feuilles beta, qui donne la forme d'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 (**He et al, 2017**).

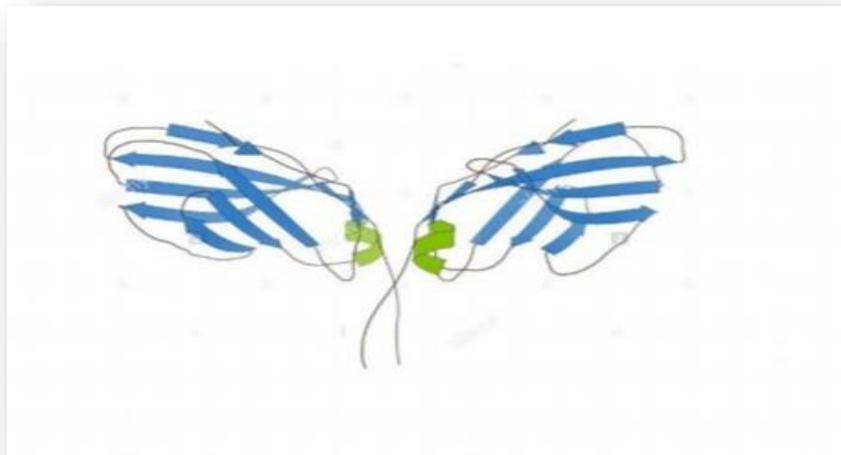


Figure 1.6 : Structure du CTLA-4(He et al,2017).

1.3.3 Expression du CTLA-4 dans le cancer colorectal :

CTLA-4 est une molécule de nature protéique qui peut être exprimé dans les lymphocytes infiltrant la tumeur et les cellules du cancer colorectal, Il existe 2 formes d'expressions de CTLA-4 soit à la surface cellulaire suite à l'activation, et intracellulaire ou comme un stockage (**Kwiecien et al, 2017**).

D'après une analyse bio-informatique de l'expression du CTLA-4 dans les lignées cellulaires du CCR (HT-29, HCT-166, SW480) à l'aide de PCR en temps réel. Les résultats obtenue mis en évidence la surexpression de la CTLA-4 dans les tissus du CCR comparés aux tissus adjacents non tumoraux et à l'aide des études in vitro que les cellules SW480 peuvent surexprimés sensiblement le CTLA-4 par rapport aux cellules HT-29 et HCT116, de plus, la capécitabine peut régule à la basse l'expression de CTLA-4 dans les cellules SW480 (**Afshin Derakhshani et al, 2021**).

1.3.4 Rôle du CTLA-4 dans le cancer colorectal :

CTLA-4 augmente l'activation des LT en produisant des signaux inhibiteurs pendant la tumorigénèse et en diminuant la réponse immunitaire contre la tumeur. C'est une molécule hautement endocytaire qui se lie à 2 ligands distincts, CD80 et CD86 conduisant à l'élimination des cellules opposées (Rowshanravan et al, 2018).

Après l'activation du récepteur des cellules T (TCR), CTLA-4 provoque l'induction de l'IDO (indoleamine-2,3-dioxygénase) et favorise l'expression de la protéine Casitas-B-lineage lymphoma (Cbl)-b (Li D et al, 2004). Il supprime la formation de protéine ZAP-70 (Zeta-chain-Associated Protein kinase 70) (Guntermann C, Alexander DR, 2002), et induit également une inhibition de PI3K/Akt (Parry RV et al, 2005), de la cycline D3-cdk4/6 (Kubsch S et al 2003) et de NF- κ B (Olsson C et al, 1999), afin de réguler négativement la prolifération et l'activation des cellules T en produisant des signaux inhibiteurs pour affaiblir la réponse immunitaire contre la tumeur (Khailaie et al, 2018).

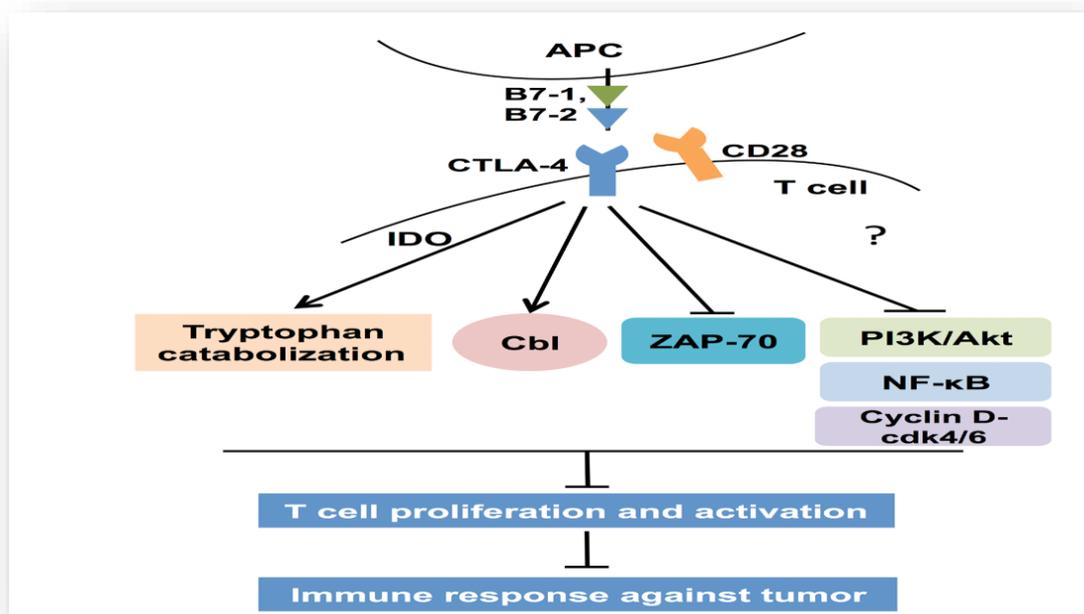


Figure 1.7 : Fonction de CTLA-4

1.3.5 Signalisation CTLA-4 dans le cancer colorectal :

La voie de signalisation du TCR implique la phosphorylation des motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs) du complexe TCR-CD3 via les protéineskinases de la famille Src : Lck (liée à CD4 ou CD8) et Fyn. Une fois les motifs ITAM phosphorylés, ils se lient au domaine SH2 de la ZAP-70 et de la SYK (Spleen tyrosine kinase) permettant l'activation des LAT (Linker Activated T cells) générant ainsi la formation d'un premier complexe multi-protéique à la membrane responsable du déclenchement de la cascade de signalisation initiée par l'engagement du TCR. CTLA-4 interagit avec ITAM sur TCR-CD3 bloquant la phosphorylation de la protéine ZAP-70, inhibant ainsi l'activation des lymphocytes

(Schneider H, Smith X et al, 2008).

CTLA-4 peut également avoir une action inhibitrice sur la membrane lipidique. La signalisation via le TCR et CD28 induit l'apparition de radeaux lipidiques **(Martin M et al, 2001)**. CTLA-4 réduit la présence de phospho-LAT dans ces domaines membranaires. Cette protéine est impliquée dans l'induction des radeaux lipidiques, conduisant à l'inhibition du signal TCR par CTLA-4 **(Chikuma S et al, 2003)**.

Le CTLA-4 se lie par son motif intra-cytoplasmique YVKM à la phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), aux tyrosines phosphatases 1 et 2 (SHP1 et SHP2), et à la serine/thréonine phosphatase 2A (PP2A). L'interaction entre CTLA-4 et ses ligands (CD80/CD86), permet à SHP1 et SHP2 de déphosphoryler les protéines impliquées dans l'activation du TCR (ZAP-70 et LAT), tandis que PP2A intervient dans le processus d'activation de l'Akt. Il est important de noter que l'engagement de CTLA-4 conduit au recrutement de PI3K, permettant l'anergie des cellules T tout en évitant la mort cellulaire par apoptose **(Schneider H et al, 2008)**. La liaison du CTLA-4 avec la PI3K permet une activation de la voie protéine kinase B/Akt (PKB/Akt) qui induit la phosphorylation du BAD augmentant l'expression du Bcl-2 et du Bcl-XL impliqués dans la survie cellulaire. D'autres voies de signalisation dépendantes de la PI3K ont été étudiées : le CTLA-4 active la voie JNK (c-JUN N-terminal kinase) dans les LT CD4⁺ mais inhibe la voie des ERK (extracellular signal-regulated kinase) **(Schneider H, Mandelbrot DA et al, 2002)**.

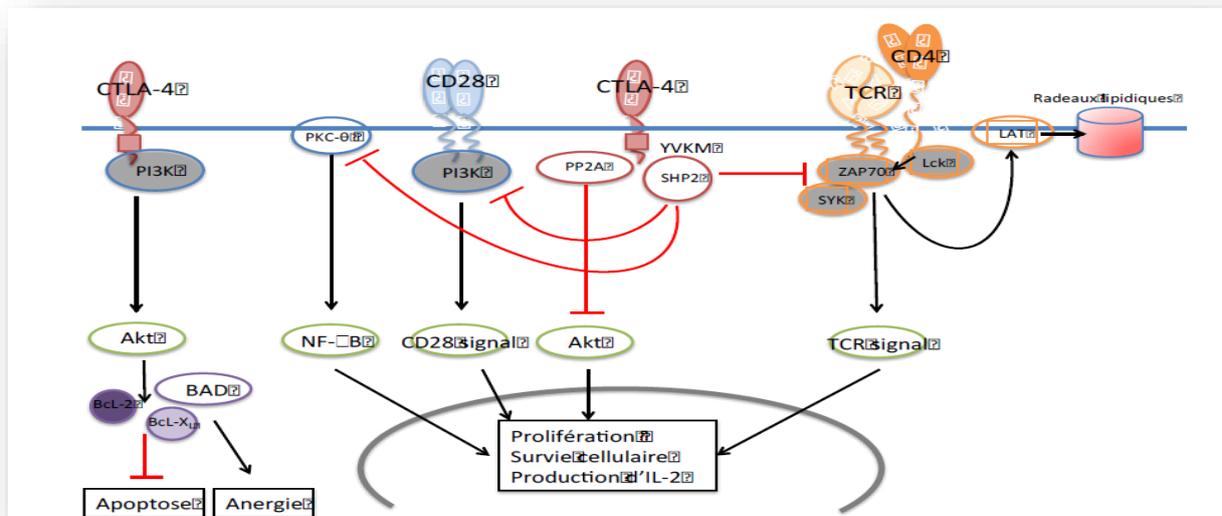


Figure 1.8 : Voies de signalisation du CTLA-4 (Rudd, Immunol Rev, 2009.)

1.3.6 Polymorphisme de gène CTLA4 :

Il existe plus de 100 polymorphismes nucléotidiques de CTLA-4 qui jouent un rôle dans certaines maladies auto-immunes et cancers (Qi P, Ruan CP et al, 2010). Ils sont capables de changer au moins une séquence d'acide aminé dans la séquence leader, et par conséquent on a un changement dans les fonctions principales du CTLA-4 (Yu-Ching Weng et al, 2005) parmi lesquels on a les polymorphismes rs3087243G>A, rs16840252 C>T, rs733618 T>C, rs231775 G>A qui peuvent entraîner un risque du cancer colorectal (Chen Zou et al, 2018).

1.3.7 Ciblage du CTLA-4 dans la thérapie du cancer colorectal :

CTLA-4 a un rôle critique dans la régulation des réponses immunitaires pour les tumeurs et elle est considérée comme une cible potentielle pour l'immunothérapie des tumeurs. Un certain nombre de stratégies de thérapie anti CTLA-4 reposent sur l'amélioration de la costimulation, y compris l'utilisation de cellules tumorales irradiées exprimant le GM-CSF (Granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor) pour améliorer l'amorçage croisé des lymphocytes T par CPA, des cellules dendritiques pulsées avec des peptides ou de l'ARN pour permettre l'immunisation en conjonction avec un CPA (Wolchok JD et al, 2008).

Des études précliniques ont confirmé que le blocage de CTLA-4 potentialisait l'immunité thérapeutique contre le cancer. Actuellement, les anticorps ciblant CTLA-4 (ipilimumab

ettremelimumab) ou en combinaison avec d'autres thérapies ont considérablement renforcé l'effet antitumoral et amélioré le pronostic de la maladie maligne (Sabel MS et al, 2005).

1.4 Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src

1.4.1 Implication du gène SRC dans le CCR :

La Src est impliquée dans la pathogenèse du CCR. Elle a été identifiée pour la première fois chez des patients atteints de CCR. Les niveaux moyens d'expression de Src chez les patients atteints de CCR seraient 2,4 fois plus élevés que ceux de la muqueuse des sujets normaux (Wook Jin, 2020).

L'expression et l'activité de Src sont régulées positivement chez les patients atteints de CCR. L'activation des Src favorise la prolifération des cellules du CCR, les métastases vers d'autres organes et la chimiorésistance, ainsi que la formation de cellules souches cancéreuses (CSC). Le niveau d'expression accru de Src est associé à une diminution de la survie chez les patients atteints de CCR. La régulation médiée par Src de la progression du CCR implique divers récepteurs membranaires, modulateurs et suppresseurs, qui régulent l'activation de Src et ses cibles en aval par divers mécanismes (Wook Jin, 2020).

1.4.2 Structure de Src

Structurellement, tous les membres de la famille Src sont constitués d'un domaine Src homologie (SH) 4, d'un domaine unique, d'un domaine SH3, d'un connecteur SH3-SH2, un domaine SH2, un lieu SH2-kinase, un domaine kinase, et une région régulatrice de la queue C-terminale (Chong YP, Mulhern TD, Cheng HC, 2005). SH4 se lie à la membrane cellulaire par son site de myristoylation. SH4 pourrait médier des interactions protéiques qui sont spécifiques à chaque membre de la famille Src en raison d'une région unique avec une faible conservation. SH3 contacte d'autres protéines en se liant à des motifs contenant des séquences riches en proline. SH2 se lie à des motifs peptidiques spécifiques qui contiennent de la tyrosine phosphorylée. SH1 catalyse la phosphorylation et contient un site consensus d'autophosphorylation qui est requis pour l'activation complète de Src (Yeatman TJ, 2004).

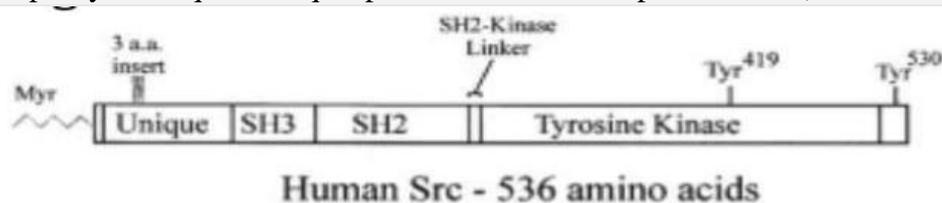


Figure 1.9 : structure de Src

1.4.3 Relation entre CTLA-4 et SRC

L'analyse de la séquence de CTLA-4 montre la présence de deux résidus tyrosine cytoplasmiques aux positions 165 et 182 qui sont des sites potentiels de liaison au domaine d'homologie Src (SH)-2 (Bluestone, J. A. 1997) et un motif riche en proline capable de lier SH3 contenant des protéines (Chambers, C. A., J. P. Allison. 1997). Le rôle de la phosphorylation de ces résidus dans la signalisation médiée par CTLA-4 est inconnu. Des expériences sur des cellules T primaires activées ont montrés une association entre CTLA-4 et la PI3K (Schneider et al, 1995) et le domaine SH-2 contenant protéine (SHP)-2 phosphatase (Marengere, L et al, 1996). Ces associations ont été expliquées par des interactions entre les domaines SH-2 de ces molécules et les résidus phosphotyrosine intracellulaires sur CTLA-4.

Il a été découvert que SHP-2 était recruté par une molécule CTLA-4 mutante dépourvue des résidus tyrosine 165 et 182 (Lee, K et al, 1998). Cette molécule CTLA-4 mutante s'est associée à TCR ζ et SHP-2 de manière dépendante de Ick, conformément à l'association rapportée entre CTLA-4 et Src - kinases (Chuang, E et al, 1999). Cependant, la pertinence fonctionnelle de ces résultats n'a pas été établie. Ainsi la signalisation négative via CTLA-4 agit sur une voie intracellulaire strictement dépendante de l'engagement du TCR (Teft WA et al, 2006) qui conduit à la phosphorylation de CTLA-4 par les kinases Src (Baroja ML et al, 2000).

1.4.4 Mutation responsable du CCR :

Irby et al ont identifié une transition de C à T dans le codon 531, qui a changé le codon de gln au codon stop (Q531X). La mutation a été trouvée dans 12 % des tumeurs du cancer du côlon humain avancé testées. La mutation n'a pas été identifiée dans des échantillons de cancer du côlon humain primaire, à un stade précoce, ni dans l'ADN génomique normal de patients dont les tumeurs portaient la mutation SRC codon 531 (Irby, RB et al, 1999).

1.5. Polymorphisme nucléotidique

1.5.1 Origine des polymorphismes nucléotidique :

Un SNP est une variation dans un nucléotide unique qui se produit à une position spécifique dans le génome. Les SNPs sont les variations d'ADN les plus fréquentes dans le génome humain. (F. S. Collins et al, 1998). Ces variations sont dues à des mutations ponctuelles caractérisées par un changement dans un nucléotide, qui donnent naissance à différents allèles contenant des bases alternatives à une position nucléotidique donnée dans un locus (Altshuler D et al, 2000).

En raison de leur grande abondance dans le génome humain, les SNP sont déjà le type de marqueurs prédominants. Ils pourraient être utilisés à la fois pour différencier les individus les uns des autres et pour des études de liaison afin de surveiller les maladies génétiques (**Loubna ALLAM, 2020**).

1.5.2 Classification des polymorphismes nucléotidiques

Les polymorphismes mononucléotidiques peuvent appartenir à des séquences codantes de gènes, à des régions non codantes de gènes ou à des régions intergéniques (régions entre gènes) :

□ Les SNPs des régions non codantes :

Jouent un rôle important dans la formation de la structure de la chromatine maladies (**Schaub MA et al, 2012**) et régulent l'expression des gènes et sont impliqués dans une grande variété de (**Molineris I et al, 2013**) comme ils peuvent affecter la structure d'ARNm (**Lu YF, et al, 2015**).

□ Les SNPs des régions codantes :

Les SNP synonymes : ne produisent pas de séquences codantes modifiées (**Chava Kimchi-Sarfaty et al, 2007**). En raison de la redondance du code génétique, la substitution d'un codon par un autre codon peut donner le même acide aminé.

Des études ont montré que les polymorphismes synonymes peuvent modifier l'épissage d'ARNm (**Cartegni L et al, 2002**), sa structure (**Shen LX et al, 1999**) ou sa stabilité (**Nackley AG et al, 2006**), mais aussi la traduction et le repliement des protéines (**Kimchi-Sarfaty C et al, 2007**).

Les SNP non synonymes :

- **Faux-sens** : c'est une transition (changement pyrimidine/pyrimidine ou purine/purine) ou une transversion (changement purine/pyrimidine ou l'inverse). qui entraîne une modification de l'acide aminé de la protéine et son dysfonctionnement qui conduit à la maladie (**Al-Haggar M et al, 2012**).
- **Non-sens** : un changement dans une séquence d'ADN qui entraîne un codon stop prématuré ou un codon non-sens dans l'ARNm transcrit et donne un produit protéique tronqué, incomplet et généralement non fonctionnel (**Cordovado SK et al, 2012**).

1.5.3 Avantages et inconvénients des polymorphismes nucléotidiques

A. Avantage :

Les SNP identifiés constituent une source importante pour les études génétiques de la communauté scientifique afin de cartographier le génome. Ils sont devenus des marqueurs de choix à cause des avantages suivants :

- Ils sont disponibles et très nombreux (environ 10 millions de SNP dans le génome humain). Ils participent au développement de plateformes de génotypage à haut niveau en permettant le génotypage de centaines de milliers de SNP chez chaque individu (**Schmid KJ et al, 2003**).
- Le séquençage complet de l'ADN humain a permis d'identifier les gènes qui déterminent les traits morphologiques tels que la couleur des yeux ou des cheveux. Ces gènes présentent un polymorphisme de séquence. L'analyse des SNP correspondants permettra donc d'identifier certaines caractéristiques morphologiques de manière entièrement automatisée et en un temps rapide.
- Le développement des biotechnologies permet aux SNP de devenir des marqueurs génétiques utilisés pour la sélection assistée par marqueur (**Flint-Garcia SA et al, 2003**), l'étude des conservations évolutives entre différentes espèces (**Feltus FA et al, 2004 ; Hillier LW et al, 2007**) et la détection d'allèles associés à des risques de maladies humaines (**Eberle MA et al. 2007**), le clonage cartographique (**Wang C, Liu Z. 2006**).

B. Les inconvénients :

Les inconvénients des SNPs sont leur faible degré de polymorphisme donc les SNPs sont très limités. Cet inconvénient peut être compensé par le nombre des SNPs analysés (**Bernard China, et al, 2004**).

1.5.4 Application des polymorphismes nucléotidiques :

Les SNPs sont considérés comme une nouvelle génération de marqueurs pour l'identification de loci associés à des maladies complexes et pour des applications pharmacogénétiques. Ils sont pour la plupart bi-alléliques. En plus d'être faciles à doser, les SNP favorisent la combinaison de l'analyse de liaison avec les données phénotypiques et génotypiques, et permettent d'unifier l'approche des gènes candidats et la cartographie fine basée sur l'association pour déterminer les gènes d'intérêt.

Ces études pourraient améliorer notre compréhension de la maladie, les méthodes de diagnostic et le développement de nouvelles thérapies plus efficaces (**Loubna Allam, 2020**).

1.5.5 Rôle des polymorphismes nucléotidiques dans le traitement des cancers

Les SNP représentent la classe la plus abondante de polymorphismes humains. Ce qui leur confère un grand intérêt dans le domaine médical, car ils peuvent être utilisés comme marqueurs pour identifier les gènes qui ont un lien avec des maladies complexes comme le cancer colorectal et exploiter le potentiel de la pharmacogénomique dans l'analyse de la réponse variable aux médicaments (**Sobrinho B et al, 2005**).

De nombreuses enzymes responsables du métabolisme des médicaments, des cibles médicamenteuses ou des voies cibles peuvent être affectées par des SNP. Les SNP impliqués dans les activités enzymatiques du métabolisme des médicaments peuvent modifier la pharmacocinétique d'un médicament, tandis que les SNP impliqués dans la cible ou la voie d'un médicament peuvent modifier la pharmacodynamique du médicament. Par conséquent, les SNP sont des marqueurs génétiques potentiels qui peuvent être utilisés pour prédire l'exposition aux médicaments ou l'efficacité du traitement (**Daly, Ann K, 2017**).

1.6. Analyse in silico des polymorphismes nucléotidiques

1.6.1 Définition d'analyse *in silico* :

Les études *in silico* utilisent des bases de données provenant d'expériences *in vivo* ou *in vitro* pour analyser, à l'aide des logiciels informatiques, les propriétés désirables ou indésirables d'une substance en fonction de sa structure ou de sa réactivité (**Laribi A, Rabahi K, 2017**). C'est un domaine qui englobe un très large éventail de méthodes numériques basées sur les lois de la physique et de la chimie qui utilisent des approches mathématiques pour simuler ou modéliser un phénomène biologique à l'aide d'outils informatiques (**Cramer CJ, 2004**).

1.6.2 Intérêt d'analyse in silico des polymorphismes nucléotidiques :

Les SNP peuvent modifier la fonction et le phénotype des protéines, le nombre exponentiel de SNP rend impossible la réalisation d'expériences au laboratoire pour déterminer l'importance biologique de chacun d'entre eux. Cependant, des outils bio-informatiques peuvent être utilisés pour rechercher des SNP potentiellement délétères qui pourraient affecter des cibles médicamenteuses importantes avant une étude plus approfondie par des techniques de laboratoire. Cela se traduit par une réduction des coûts et un gain de temps (**James T.L, 2011**).

Il est possible d'utiliser des techniques *in silico* pour sélectionner les régions codantes et les régions régulatrices hautement conservées pour découvrir de nouveaux SNP et déduire leurs fonctions (James T.L, 2011).

Les outils de prédiction des SNP peuvent être basés sur la séquence ou sur la structure (Miller, M.P. and Kumar, S. 2001), car la plupart des SNP pathogènes affectent la stabilité des protéines (Wang, Z. and Moul, J. 2001) et les règles basées sur la structure ont été établies pour distinguer les SNP fonctionnellement importants de ceux qui sont fonctionnellement neutres (Sunyaev, S. et al. 2000).

Il existe de nombreux outils bio-informatiques accessibles au public qui fournissent des moyens systématiques de prédire l'importance fonctionnelle des SNP, avec des scores et des annotations. Cependant, les utilisateurs doivent consacrer du temps et des efforts à la sélection de l'outil le plus approprié à utiliser (James T.L, 2011).

1.7 Problématique et objectif :

1.7.1 Problématique :

Dans notre étude, nous effectuons une analyse *in silico* des polymorphismes nucléotidiques (SNP) ayant des conséquences fonctionnelles sur le CTLA-4 dans le cancer colorectal, afin de les identifier *in silico* et les proposer à des tests de confirmation *in vitro* et *in vivo* et explorer de nouvelles perspectives dans le diagnostic et le traitement du CCR.

1.7.2 Objectif :

L'objectif ultime de notre étude c'est de :

- Réaliser une analyse *in silico* des SNPs à conséquences fonctionnelles sur le CTLA-4 et le Src dans le cancer colorectal afin de sélectionner les délétères.
- Déterminer les SNPs fonctionnel
- Déterminer les SNPs qui ont un effet sur la stabilité des protéines
- Déterminer les SNPs qui ont un effet sur la conservation de la protéine.

1.7.3 But :

Le but de notre étude c'est d'identifier les SNPs du gène CTLA-4 et du gène Src par des outils *in silico* pour la prévention du cancer colorectal.

CHAPITRE II :
MATERIEL
ET
METHODES

II. Matériel et méthodes

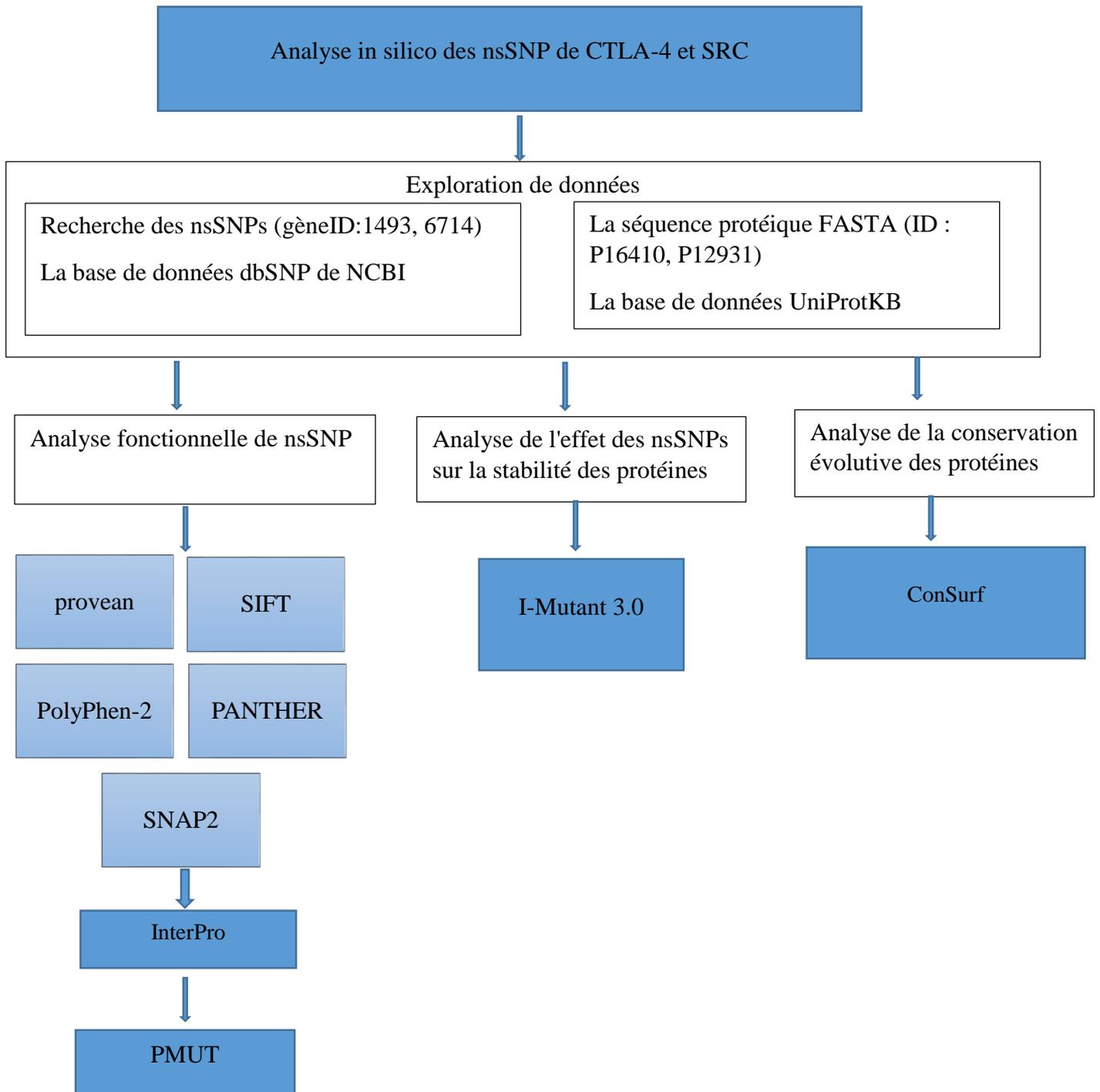


Figure 2.1 : study design

2.1 Exploration de données

On utilise la base de données dbSNP du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>) pour récupérer les SNP du gène CTLA-4 et du gène SRC (Sherry ST, et al 2001). Les séquences primaire des protéines (numéro d'accèsion Uniprot : P16410 et P12931) codées par les gènes CTLA-4 et SRC ont été obtenues à partir de la base de données UniProt. Seuls les nsSNPs (polymorphisme nucléotidique non synonyme) ont été choisis à partir de la base de données dbSNP du NCBI car ils peuvent modifier la séquence de la protéine et ont le potentiel de perturber l'arrangement structurel et la fonction des protéines (Brenda Udosen et al, 2021).

Les séquences en acides aminés FASTA des protéines (CTLA-4 (P16410) et SRC (P12931) ont été obtenues suite à une recherche par numéro d'accèsion sur Uniprot (CTLA-4 (P16410) et SRC (P12931) a été utilisée comme séquence de recherche des SNPs et pour effectuer les autres analyses et un total de 99 nsSNP du CTLA-4 et 266 nsSNP du SRC sélectionnés à partir de la base de données dbSNP ont été analysés.

The screenshot shows the NCBI dbSNP interface for the gene CTLA4. The search bar contains 'dbSNP' and 'CTLA4'. The main content area displays 'SNP linked to Gene (genelD:1493) Via Contig Annotation'. Below this, there is a table of gene models and a detailed table of SNPs.

Region	Chr. position	mRNA pos	dbSNP rs# cluster id	Heterozygosity	Validation	MAF	Allele origin	3D	Linkout	Function	dbSNP allele	Protein residue	Codon pos	Amino acid pos	PubMed
	203867946	159	rs767352102	0.000						missense	T	Ser [S]	1	2	
										contig reference	G	Ala [A]	1	2	
	203867950	163	rs128940807	N.D.						missense	T	Phe [F]	2	3	
										contig	C	

Figure 2.2 : Base de données dbSNP de NCBI

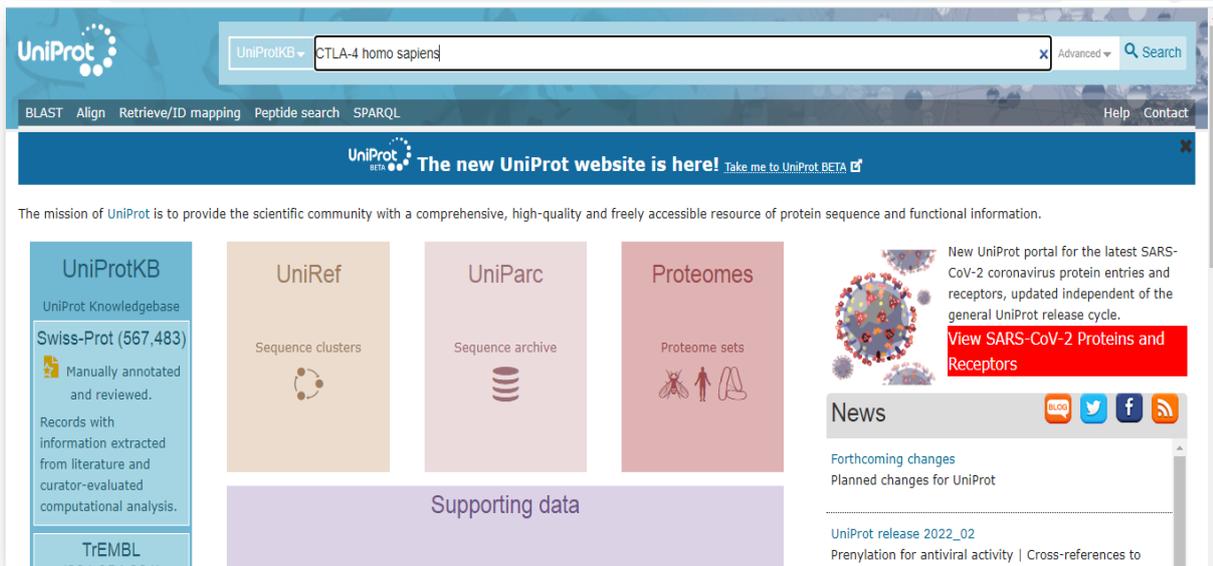


Figure 2.3 : UniProtKB

2.2 Prédiction des nsSNP délétères par différents outils de bioinformatique

Plusieurs outils en ligne ont été utilisés pour déterminer les nsSNP délétères associées aux gènes CTLA-4 et SRC. Tout d'abord, des nsSNP des gènes CTLA-4 et SRC sélectionnés par la base de données dbSNP du NCBI ont été soumis à une analyse grâce aux outils suivants SIFT (Sorting Intolerant from Tolerant) (SIFT ; <http://sift.bii.a-star.edu.sg/>), Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen v2 ; <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer, http://provean.jcvi.org/seq_submit.php), SNAP2 (Screening of Non-Acceptable Polymorphism 2; <https://roslab.org/services/snap2web/>), PANTHER (Protein Analysis Through Evolutionary Relationship ; <http://www.pantherdb.org/tools/csnpscoreform.jsp>).

SIFT nous a permis de prédire si la substitution d'un acide aminé a un effet dommageable sur la fonction de la protéine en se basant sur l'alignement et l'homologie des séquences (**Sim N-L et al, 2012**). SIFT donne une probabilité d'observer un nouvel acide aminé à cette position spécifique (**Ng PC, Henikoff S, 2001**), et un score inférieur ou égal au seuil de 0,05 est délétère, et une prédiction supérieure au seuil est tolérée (**Ng PC, Henikoff S, 2002**).

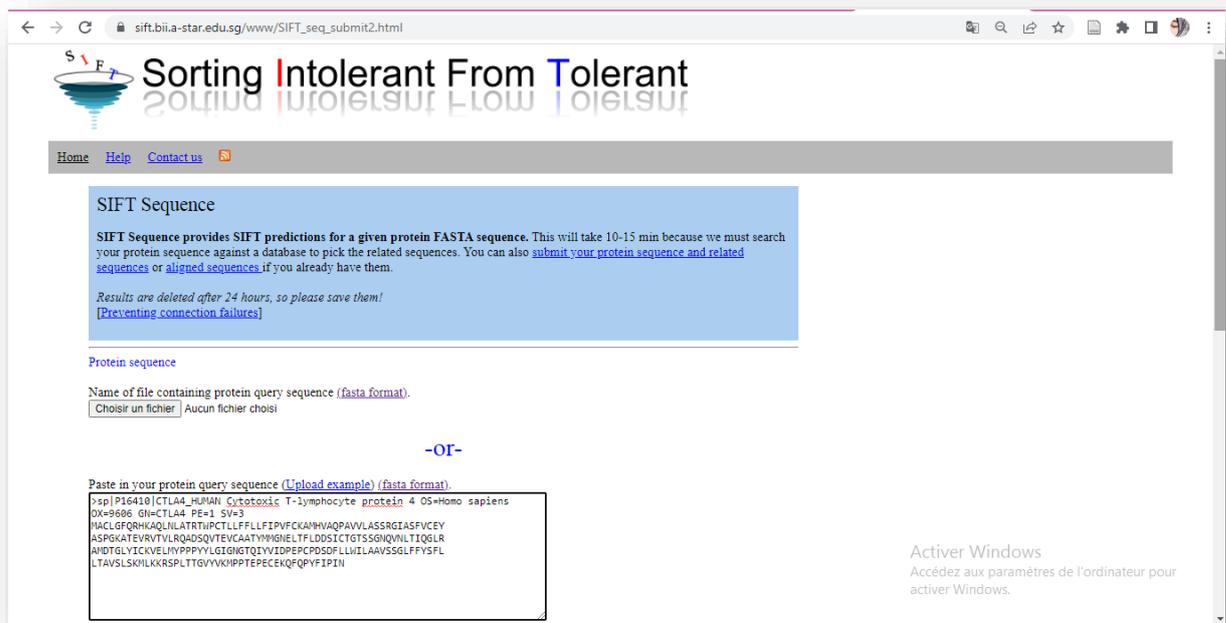


Figure 2.4 : logiciel SIFT

Nous avons utilisé **PolyPhen v2** pour prédire l'influence de la substitution des acides aminés sur la structure et la fonction des protéines en utilisant des règles spécifiques empiriques. La protéine de la base de données, la position de l'acide aminé et les détails de la variante de l'acide aminé sont les options d'entrée de PolyPhen (**Ramensky et al, 2002**). Le résultat de PolyPhen v2 est une prédiction indiquant que la substitution est probablement dommageable, possiblement dommageable, ou bénigne, ainsi qu'un score numérique allant de 0,0 (bénin) à 1,0 (dommageable) (**Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR (2013)**).

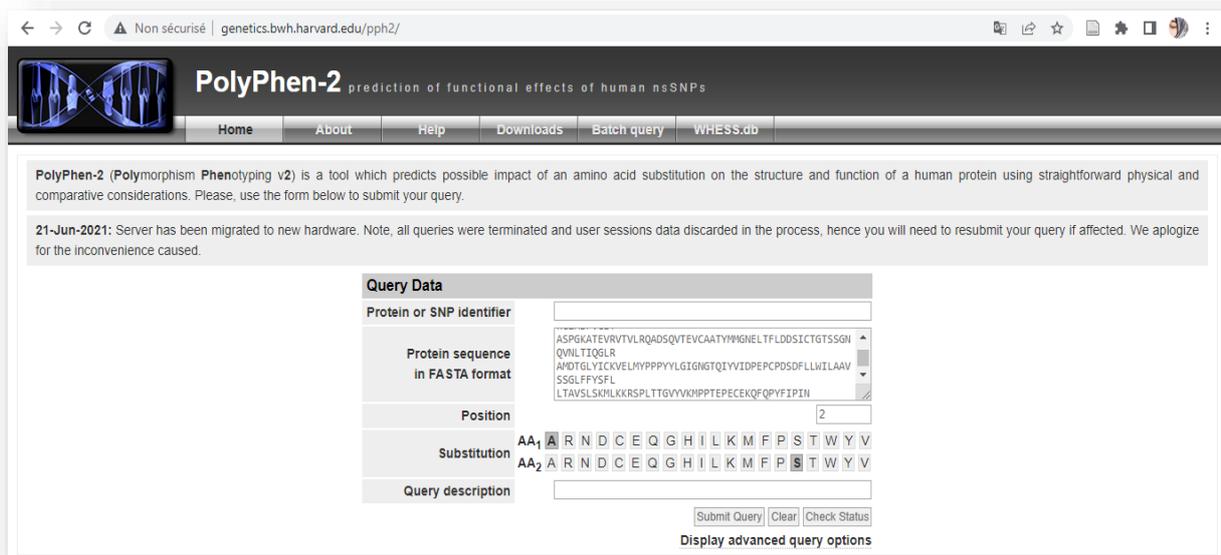


Figure 2.5 : Logiciel PolyPhene v2

PROVEAN est un outil permettant de prédire l'effet fonctionnel des substitutions, insertions et délétions d'acides aminés, qui introduit un score d'alignement delta d'une séquence de requête protéique pour mesurer l'effet d'une variation. Les scores delta élevés sont considérés comme des variations avec des effets neutres, alors que les scores delta faibles sont considérés comme des variations d'acides aminés ayant des effets négatifs sur fonction de la protéine. Afin de fournir des prédictions binaires, la valeur seuil des scores PROVEAN est fixée à 2,5 pour obtenir une grande précision équilibrée (Choi Y et al, 2012). La requête d'entrée est une séquence FASTA de protéine avec les substitutions d'acides aminés.

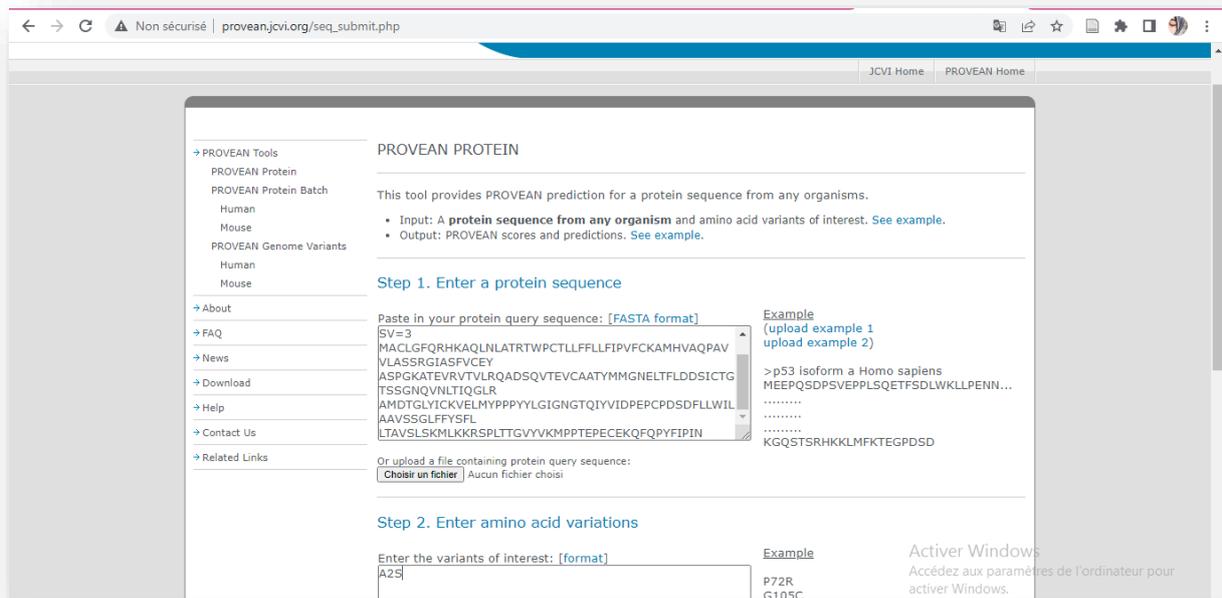


Figure 2.6 : PROVEAN

SNAP2 est une méthode basée sur un réseau neuronal, elle classe toutes les nsSNP en deux catégories : dommageable et neutre (Bromberg Y, Rost B (2007). Considéré comme l'une des méthodes les plus fiables avec une précision de 83%. Le signal d'entrée le plus important pour la prédiction est l'information sur l'évolution provenant d'un alignement de séquences multiples généré automatiquement. Bien qu'il prenne plus de temps cités pour obtenir le résultat par rapport aux logiciels précédemment, mais il a un niveau de précision significatif (une précision soutenue à deux états (effet/neutre) de 82 %) (Hecht, M., Bromberg, Y., Rost, B., 2015).

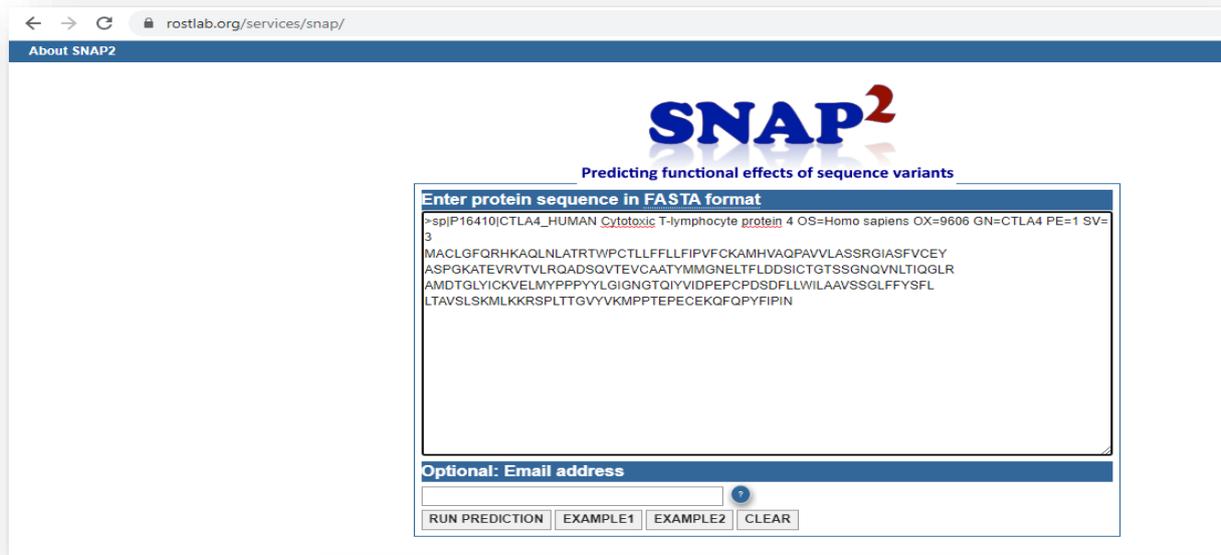


Figure 2.7 : logiciel SNAP2

PANTHER estime la probabilité qu'un nsSNP particulier peut causer un impact fonctionnel sur la protéine. Il calcule le score subPSEC (substitution position-specific evolutionary conservation) sur la base d'un alignement de protéines évolutives associées (**Thomas et Kejariwal, 2004**). Le P délétère estime la probabilité qu'une substitution donnée provoque ou non un effet délétère sur la fonction protéique, où le score subPSEC ≤ -3 classe les substitutions d'AA comme délétères et le score ≥ -3 prédit comme une substitution neutre (**Brunham LR et al, 2005**).

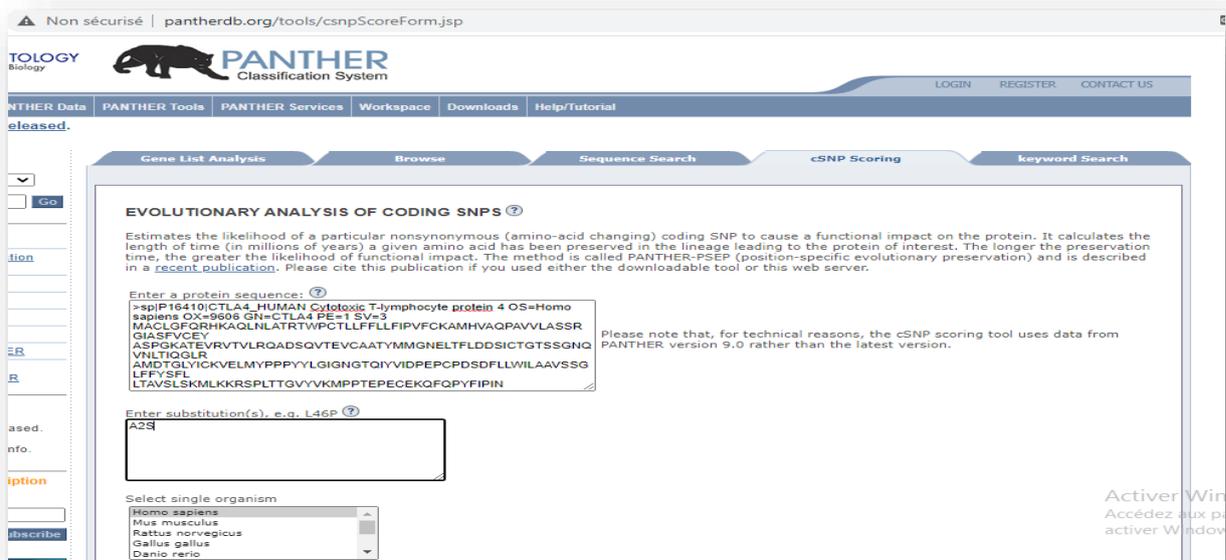


Figure 2.8 : PANTHER

2.3 Identification de divers domaines dans CTLA-4 ET Src et le triage des effets des SNP sur ces domaines

Afin de déterminer la localisation des nsSNPs sur les domaines conservés des gènes étudiés, nous avons utilisé l'outil InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) (Hunter, S et al, 2011), qui permet de reconnaître les motifs et les domaines d'une protéine et ainsi identifier la caractérisation fonctionnelle d'une protéine en utilisant la base de données constituée de familles de protéines, de domaines et de sites fonctionnels (Apweiler, R et al, 2001).

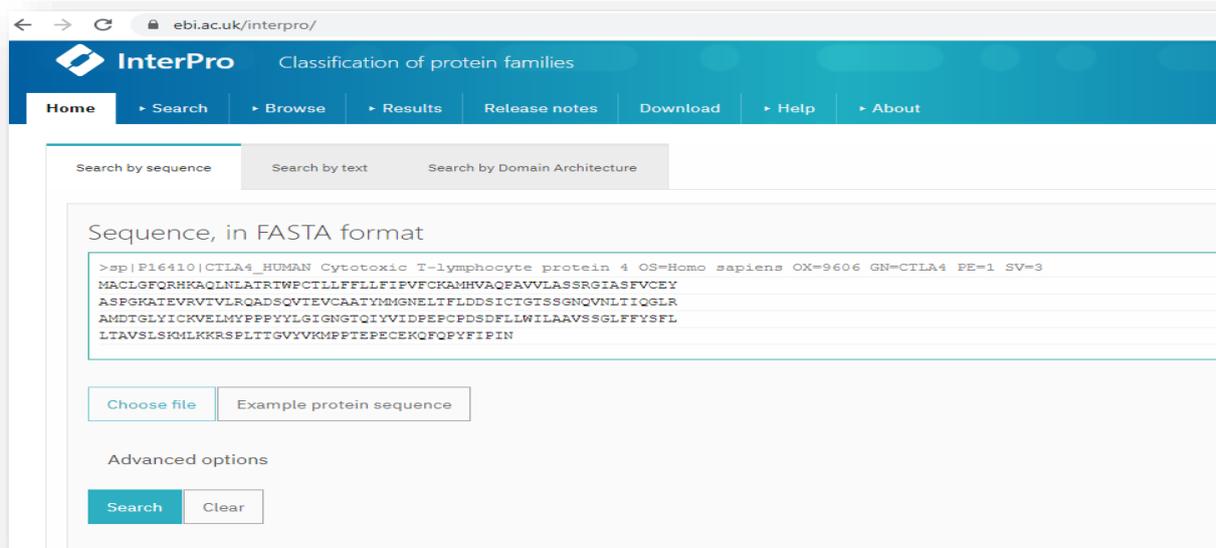


Figure 2.9 : l'outil InterPro

2.3 Validation des nsSNP à haut risque :

PMUT (<http://mmb.irbbarcelona.org/PMut/>) s'agit d'un outil d'analyse fonctionnelle en ligne permettant de prédire l'effet de l'altération des SNP sur les protéines (López-Ferrando et al, 2017). Il calcule la pathogénicité de chaque variante dans nos protéines CTLA-4 et Src (Ferrer-Costa et al. 2005).

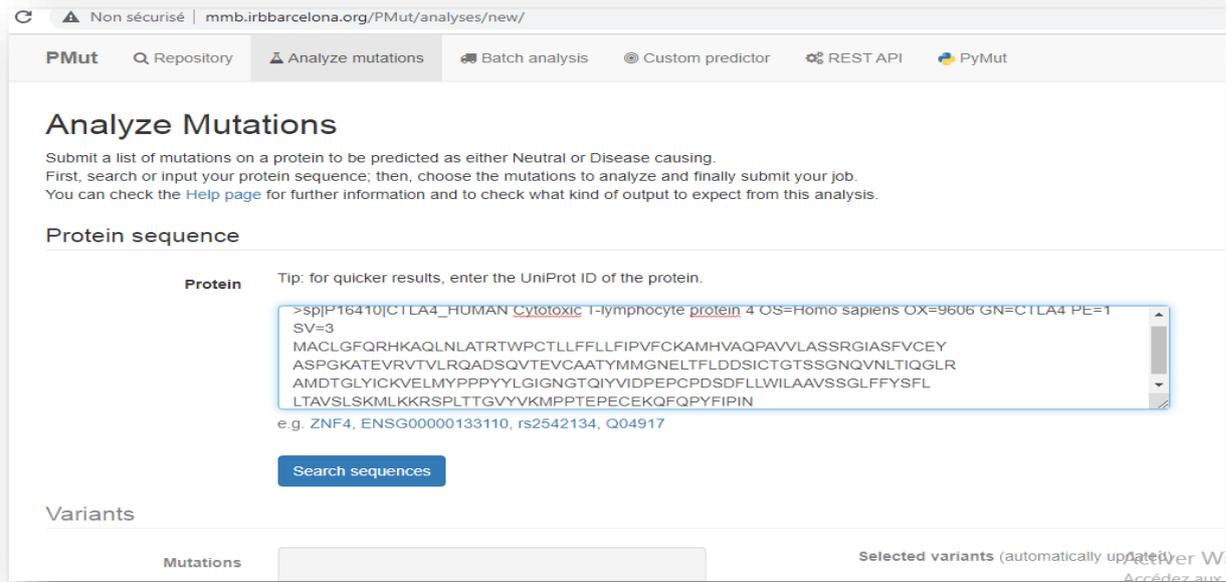


Figure 2.10 : PMUT

2.5 Analyse de l'effet des nsSNPs sur la stabilité des protéines :

I-Mutant 3.0 (<http://gpcr2.biocomp.unibo.it/cgi/predictors/I-Mutant3.0/I-Mutant3.0.cgi>) est un serveur web incluant une suite de prédicteurs basés sur la Machine à Vecteur de Support (SVM). Il prédit l'effet d'une substitution d'acide aminé particulière sur la stabilité d'une protéine à partir de sa séquence, de la position de la mutation et du nouveau résidu correspondant. La stabilité des protéines peut perturber à la fois la fonction et la structure de la protéine (**Daggett V, Fersht A, 2003**). I-Mutant peut fondamentalement évaluer le changement de stabilité d'une mutation sur un seul site à partir de la structure de la protéine ou à partir des séquences protéiques (**Venselaar H et al, 2010**).

I-Mutant3.0 décrit les changements dans la stabilité de la protéine entre les protéines de type sauvage et mutant en mesurant le changement de l'énergie libre de Gibbs (DDG). Il prédit la stabilité des protéines en classant les variantes comme étant des mutations déstabilisantes (DDG < -1 kcal/mol), des mutations stabilisantes (DDG > 1 kcal/mol) et mutations neutres (-1 ≤ ΔΔG ≤ 1 kcal/mol) (**Capriotti et al, 2005**).

Figure 2.11 : I-Mutant 3.0

2.6 Prédiction de la conservation évolutive des protéines

Le serveur web ConSurf (<https://consurf.tau.ac.il/>) a été utilisé pour identifier et classer chaque mutation située dans la région conservée de la protéine. En entrée, nous avons soumis la séquence FASTA de la protéine cible. Le résultat a montré les effets de chaque nsSNP sur un diagramme en couleur, avec des annotations concernant la conservation relative du résidu affecté. Les SNP avec des scores de 1-3 sont marqués comme variables, les nsSNPs avec des scores de 4-6 sont marqués comme moyens, et les SNP marqués de 7-9 sont marqués comme hautement conservés, associés à des SNP à haut risque (Ashkenazy et al, 2016).

Figure 2.12 : Le serveur web ConSurf

Chapitre III :
RESULTATS
ET
INTERPRETATION

III. Résultats et interprétation

3.1 Récupération des nsSNP dans les gènes CTLA-4 et SRC

Les nsSNP du gène CTLA-4 examinés systématiquement dans cette étude ont été récupérés de la base de données dbSNP du NCBI. Au total, 166 SNPs ont été trouvés dans la base de données pour le gène CTLA-4 humain, et parmi les SNP rapportés, 99 étaient des SNPs non synonymes, 64 étaient synonymes. Alors que 490 SNPs ont été signalés dans dbSNP pour le gène SRC chez l'humain, parmi les SNP signalés, 266 étaient des SNP non synonymes, 208 étaient synonymes. La présentation de l'ensemble des approches méthodologiques est résumée dans un schéma (**Figure 2.1**).

3.2 Prédiction des nsSNP délétères

Les nsSNPs ont ensuite été soumises à cinq outils différents (SIFT, Polyphen2, PROVEAN, SNAP et PANTHER) qui disposent des différents algorithmes de prédiction pour déterminer les nsSNPs ayant des effets délétères significatifs qui pourraient affecter la structure biologique et la fonction des protéines étudiées. Vingt-et-un nsSNPs du gène CTLA-4 ont été identifiées comme "dommageables" par au moins quatre outils (**tableau 3.1**) et 98 nsSNP pour le gène SRC (**tableau 3.2**).

Les effets des nsSNPs sur les protéines étudiées ont été catégorisés en fonction des résultats de ces algorithmes, qui sont présentés dans **la figure 3.1** et **la figure 3.2**.

SIFT : Sur la base d'une valeur limite, les variantes non synonymes ont été classées en tant que tolérées ou délétères.

Pour le gène CTLA-4 : environ 66.67 % (tolérées ou neutres) des variantes identifiées ont obtenu un score supérieur à 0.05, et environ 32.32 % des variantes non tolérées ou délétères ont obtenu un score inférieur à la valeur limite et un pourcentage de 1.01 % indique pas de résultat.

Pour le gène SRC : environ 58.27 % des nsSNPs sont des SNPs tolérés et 40.60 % des variantes sont délétères, tandis que un pourcentage de 1.13 % indique pas de résultat.

PolyPhen-2 : PolyPhen-2 a prédit les effets des mutations sur la fonction des protéines CTLA-4 et SRC en calculant une valeur standard allant de 0.0 (toléré) à 1.0 (délétère).

Pour le gène CTLA-4 : Environ 44.44 % des SNPs ont été prédits comme étant bénins, avec des scores plus proches de 0,0, tandis que 54.54 % des SNPs ont obtenu un score plus proche

de 1, avec des effets nuisibles possibles ou probables. Environ 1,01%, il a été incapable de les prédire.

Pour le gène SRC : Environ 31.58 % des SNPs ont été prédits comme étant bénins, tandis que 67.30 % des SNPs ont obtenu un score plus proche de 1, avec des effets possiblement ou probablement délétères. Environ 1,13 % sont indétectable.

PROVEAN : Cet outil distingue les SNP neutres des SNP délétères à l'aide du seuil PROVEAN, de sorte que les nsSNPs inférieurs à la valeur seuil de 2,5 ont été considérés comme ayant un effet délétère sur l'activité des protéines.

Comme le montre **la figure 3.1**, environ 18.18 % des SNPs ont été catégorisés comme ayant des effets délétères sur la protéine CTLA-4, tandis que 81.82 % ont été classés comme neutres.

Pour le gène SRC, il y a 56.42 % des SNPs neutres et 43.68 % dommageables.

SNAP2 : Cet outil a prédit des résultats basés sur un score neutre puissant et un score d'effet puissant, allant de 100 à + 100.

Sur 99 nsSNPs du gène CTLA-4, 55 variantes ont été identifiées comme affectées. 43.43 % ont été prédits "neutres", 55.56 % étaient "à effet" et les 1.01 % restants étaient introuvables.

Pour le gène SRC, au total 490 nsSNPs, 98 ont été identifiés comme ils ont un effet sur la protéine à un pourcentage de 36.84 % et environ 62.03 % ont été prédits comme étant "neutres", et les 1.13 % restants étaient inaccessibles.

PANTHER : Environ 51.52 % des nsSNPs du gène CTLA-4 ont été prédits comme étant "probablement bénins", tandis que 47.47 % ont des effets néfastes possibles ou probables. Les 1.01% sont indétectables.

Alors que pour le gène SRC, 86.09 % des variantes ont des effets nuisibles possibles ou probables et 12.78 % ont des effets bénins. Les autres (1.13 %) sont introuvables.

Tableau 3.1 : Liste des résultats de l'analyse des nsSNPs CTLA-4 par cinq programmes *in silico*.

SNP ID	AA change	SIFT prediction	Polyphene prediction	Provean prediction	SNAP prediction	Panther prediction
rs201778935	R8W	Deleterious	Possibly Damging	neutral	effect	Possibly Damging
rs769368847	W20L	Deleterious	Possibly Damging	Deleterious	effect	probably damaging

Résultats et interprétation

rs1041117695	P21R	Deleterious	Possibly Damging	neutral	effect	Possibly Damging
rs752811424	Y60F	Deleterious	probably damaging	neutral	effect	probably damaging
rs1206369281	T72A	Deleterious	Possibly Damging	Deleterious	effect	probably benign
rs781579729	T72I	Deleterious	probably damaging	neutral	effect	probably benign
rs1196646336	R75L	Deleterious	Possibly Damging	Deleterious	effect	possibly damaging
rs1451326152	V112M	Deleterious	probably damaging	neutral	effect	Possibly Damging
rs764089901	G118R	Deleterious	probably damaging	Deleterious	effect	probably damaging
rs1286462906	T124S	Deleterious	Benign	Deleterious	effect	probably damaging
rs757773669	T124M	Deleterious	Possibly Damging	Deleterious	effect	probably damaging
rs1294482526	M134V	Deleterious	probably damaging	Deleterious	effect	possibly damaging
rs1356678649	N145H	Deleterious	probably damaging	Deleterious	effect	possibly damaging
rs1204026047	N145S	Deleterious	probably damaging	neutral	effect	possibly damaging
rs1466152724	T147A	Deleterious	probably damaging	Deleterious	effect	probably damaging
rs745734610	P158L	Deleterious	probably damaging	Deleterious	effect	possibly damaging
rs1396254904	W165R	Deleterious	probably damaging	Deleterious	effect	possibly damaging
rs1348195897	V170F	Deleterious	Possibly Damging	Deleterious	effect	possibly damaging
rs1310297644	L180F	Deleterious	probably damaging	neutral	effect	possibly damaging
rs1245023275	P206A	Deleterious	probably damaging	Deleterious	effect	possibly damaging
rs778534474	P209R	Deleterious	probably damaging	Deleterious	effect	possibly damaging

Tableau 3.2 : Liste des résultats de l'analyse des nsSNPs SRC par cinq programmes *in silico*.

SNP ID	Amino acid change	SIFT prediction	Polyphene prediction	Provean prediction	SNAP prediction	Panther prediction
Rs1451326787	T99K	Tolerated	Probably damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs1340628132	F105L	Tolerated	Probably damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs772219397	R110W	Deleterious	Probably damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs762030353	T117I	Deleterious	Probably damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs1412626612	P136R	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs755055234	A141V	Deleterious	Deleterious	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs746439256	W151C	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs772598405	G154S	Deleterious	Possibly Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs769358602	R159W	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging

Résultats et interprétation

Rs1368749598	E162Q	Deleterious	Possibly Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs759443292	N170K	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs1366542593	G173V	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs6018260	L176F	Deleterious	Possibly Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs143889833	V177M	Deleterious	Probably Damaging	Neutral	effect	Probably Damaging
Rs1388458954	T182I	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs146865960	T183M	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	neutral	Probably Damaging
Rs75363208	Y187S	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs1198824064	D195N	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs1458527600	N196Y	Deleterious	Possibly Damaging	Neutral	effect	Probably Damaging
Rs7534044366	G199V	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs368312821	V202L	Deleterious	Benign	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs778554009	R208C	Deleterious	Benign	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs867236697	R208H	Deleterious	Possibly Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs1289430309	L210V	Deleterious	Probably Damaging	Neutral	effect	Probably Damaging
Rs1478333895	G214C	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs768609250	R220C	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	Effect	Probably Damaging
Rs761890358	F223L	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs1409798282	S225G	Tolerated	Possibly Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs769916129	S225I	Deleterious	Possibly Damging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs1466226424	V230A	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs149158994	Y232C	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs1433113895	D238N	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs751268997	R243H	Tolerated	Possibly Damging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs551439047	P253L	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs1455889060	L258Q	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs1235463689	E264A	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs764665699	P266L	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	neutral	Probably Damaging
Rs776941746	R267Q	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs1328205125	S269L	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs148049198	R271W	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs754650463	L272P	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs766744528	E283k	Deleterious	Benign	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs1246093856	N290S	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	neutral	Probably Damaging
Rs111844926	T292I	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	neutral	Probably Damaging
Rs750534584	A296S	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs1388365171	T299I	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	neutral	Probably Damaging
Rs956512588	L300P	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs1172425959	T304M	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs996960011	Q327H	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging

Résultats et interprétation

Rs1411658070	Y329C	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs1274322227	A330D	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs754968435	M344L	Deleterious	Benign	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs984277412	R362W	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs778642449	V367M	Deleterious	Probably Damaging	Neutral	effect	Probably Damaging
Rs1249301882	A370V	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs994208712	A374T	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs1181484011	S375L	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs764262104	R382W	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs1252138081	R388W	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs867805553	R391C	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs758795351	R391H	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs186207963	D407N	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs1274078983	E418K	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs142822674	T420M	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	neutral	Probably Damaging
Rs1459444714	R422W	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs1208655105	G424D	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs1490969287	T432M	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	neutral	Probably Damaging
Rs1200637641	P434A	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs1251506584	E435K	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs1417607384	A436T	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	neutral	Probably Damaging
Rs7456121556	Y439C	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs202242810	R441C	Tolerated	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs772053084	R441H	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs1406655378	S446L	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs1056084684	V448L	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs1171125750	T460K	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs1251532695	P465S	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs997451700	G468V	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs774838914	R472H	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	neutral	Probably Damaging
Rs1420046989	V478M	Deleterious	Probably Damaging	Neutral	effect	Probably Damaging
Rs1479989919	R480W	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs768098520	R483W	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs753395244	R483Q	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs1317072077	P485L	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs756665933	P487L	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs780921646	S493Y	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	neutral	Probably Damaging
Rs780921646	S493F	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	neutral	Probably Damaging

Rs769834016	L497F	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs1344423676	M498L	Tolerated	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs564099857	R503W	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs1159129326	P506S	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs13053388441	R509W	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs1346524802	P510A	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs1346524802	P510S	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging
Rs1358694181	T524M	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	neutral	Probably Damaging
Rs1180746688	T526I	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	neutral	Probably Damaging
Rs562042369	Q529L	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	neutral	Probably Damaging
Rs754707860	G533R	Deleterious	Probably Damaging	Deleterious	effect	Probably Damaging

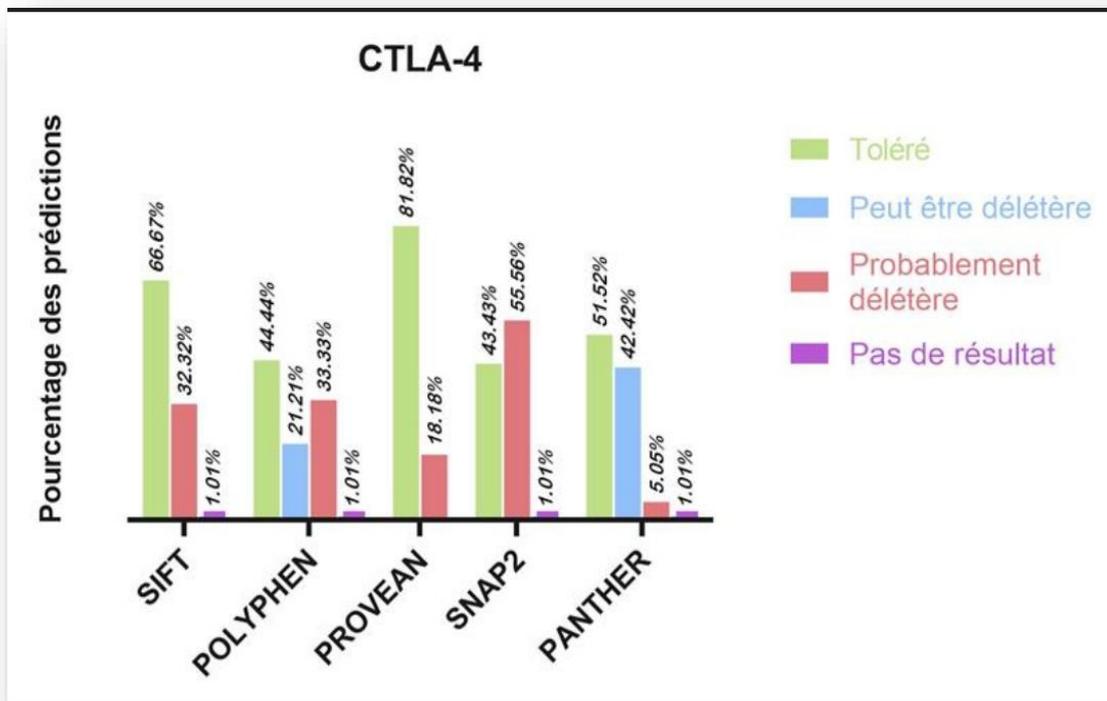


Figure 3.1 Distribution des nsSNPs dans le gène CTLA-4 basée sur les effets estimés prédits par divers outils fonctionnels.

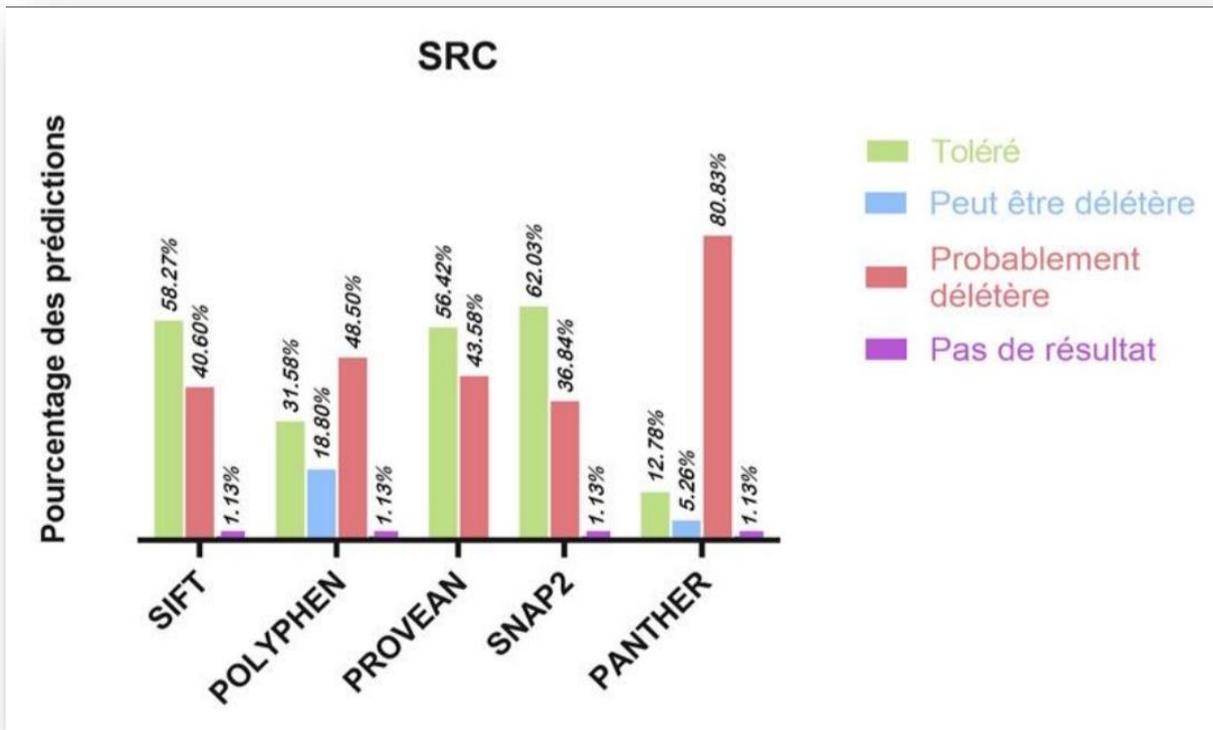


Figure 3.2 : Distribution des nsSNPs dans le gène SRC basée sur les effets estimés prédits par divers outils fonctionnels.

3.3 Identification des domaines des protéines CTLA-4 et Src et catégorisation des nsSNPs dans ces domaines.

InterPro, un outil d'identification de domaines, permet de prédire les domaines et les sites actifs d'une protéine par l'analyse fonctionnelle de familles de protéines. Il a prédit la présence d'un domaine fonctionnel de CTLA-4, qui est le domaine Ig_sub des acides aminés 43 à 152 selon le serveur InterPro (**figure3.3**). Les 12 nsSNPs les plus délétères (Y60F, T72A, T72I, R75L, V112M, G118R, T124S, T124M, M134V, N145H, N145S, T147A) ont tous été observés dans le domaine fonctionnel (Ig_sub) de la protéine CTLA-4.

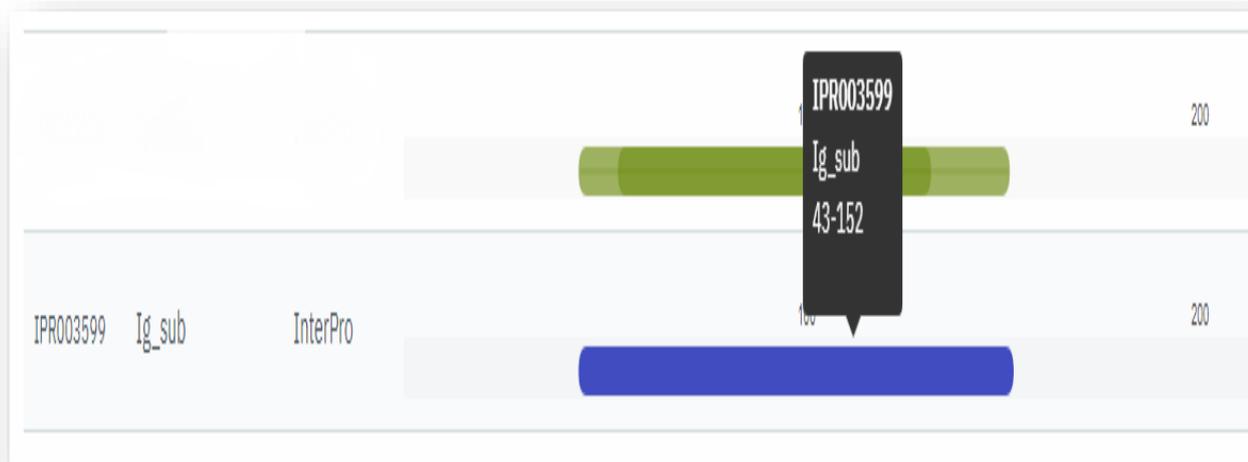


Figure 3.3 : Domaine fonctionnel de CTLA-4

Alors que la protéine SRC est composée par trois domaines fonctionnels selon le serveur InterPro qui sont SH3_domain (48-145), le domaine SH2 (149-248) et le Prot_kinase_dom (270-523) (**figure3.4**) et démontré que 88 nsSNPs sont positionnés sur ces domaines (**tableau3.3**).

Tableau 3.3 : Position des nsSNPs sur les domaines de SRC

Mutation	Domaine
T99K, F105L, R110W, T117I, P136R, A141V	SH3_domain
W151C, G154S, R159W, E162Q, N170K, G173V, L176F, V177M, T182I, T183M, Y187S, D195N, N196Y, G199V, V202L, R208C, R208H, L210V, G214C, R220C, F223L, S225G, S225I, V230A, Y232C, D238N, R243H	SH2
R271W, L272P, E283k, N290S, T292I, A296S, T299I, L300P, T304M, Q327H, Y329C, A330D, M344L, R362W, V367M, A370V, A374T, S375L, R382W, R388W, R391C, R391H, D407N, E418K, T420M, R422W, G424D, T432M, P434A, E435K, A436T, Y439C, R441C, R441H, S446L, V448L, T460K, P465S, G468V, R472H, V478M, R480W, R483W, R483Q, P485L, P487L, S493Y, S493F, L497F, M498L, R503W, P506S, R509W, P510A, P510S	Prot_kinase_dom

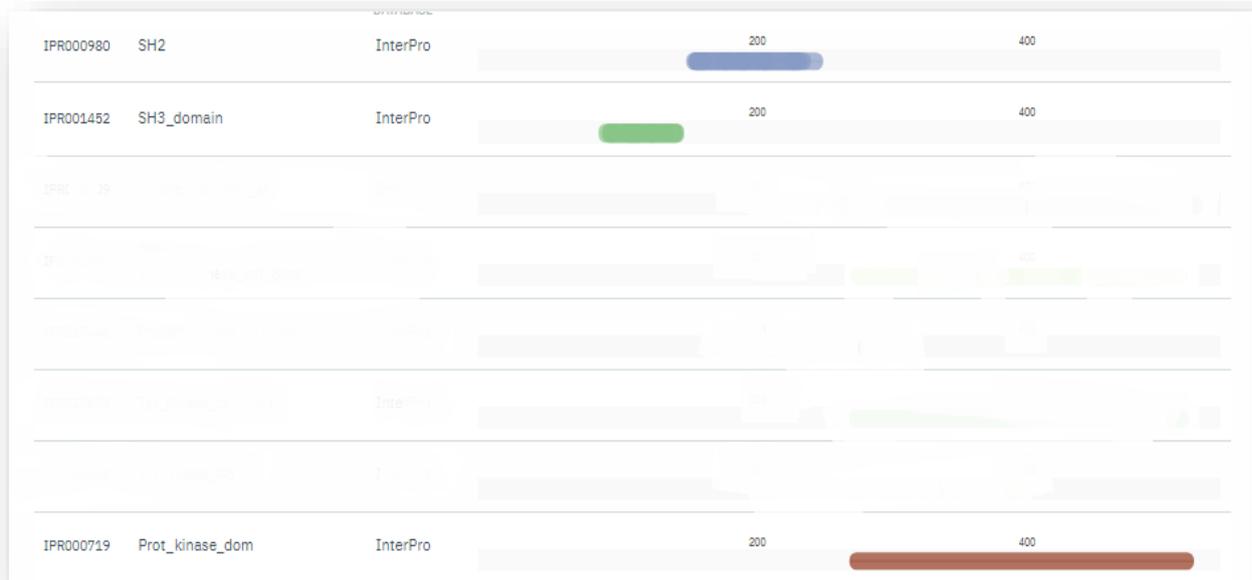


Figure 3.4 : Les domaines fonctionnels de SRC

3.4 Vérification des nsSNP à haut risque par PMut.

Les nsSNPs délétères observés dans les domaines fonctionnels ont ensuite été soumis au serveur PMut pour obtenir des résultats plus précis qui pourraient avoir un effet sur l'impact fonctionnel. PMut détermine le score, le pourcentage de probabilité et le statut de prédiction (maladie, neutre) de la protéine résultante en raison des mutations. Parmi les 12 nsSNPs délétères du gène CTLA-4, six peuvent provoquer une maladie à un pourcentage de 50 % (**Figure 3.8**), tandis que dans le gène SRC, 59 nsSNP sont responsables d'une maladie (72.84 %) et le reste a été identifié comme neutre (27.16%) (**Figure 3.7**) ;(tableau 3.4).

3.5 Détermination de la stabilité des protéines

La stabilité des protéines affecte la structure tridimensionnelle et la fonction de la protéine. Les altérations de la stabilité des protéines entraînent un mauvais repliement, une dégradation et une agrégation des protéines (**Ashkenazy, H et al, 2016**).

La stabilité structurelle des protéines résultantes a été prédite par **I-Mutant 3.0**. Le résultat d'I-Mutant 3.0 a été exprimé en valeur de variation d'énergie libre (DDG) et en indice de fiabilité (RI). Au total de six nsSNPs du gène CTLA-4 il a été confirmé que tous les six (100%) entraînent une diminution de la stabilité des protéines résultantes (**Figure 3.8**). Tandis que sur le total de 59 nsSNPs dans le gène SRC, 55 nsSNP entraînent une diminution de la stabilité de la protéine (93.22%), et seulement 26 nsSNP ont été prédits comme ayant une valeur DDG < -0,5, indiquant leur plus grand impact sur les protéines, tandis que 4 nsSNP (6.78%) augmentent la stabilité de la protéine SRC (**tableau 3.4**). (**Figure 3.7**).

3.4 Analyse de la conservation évolutive des protéines

L'analyse de la conservation évolutive a suggéré que les acides aminés situés dans les régions conservées ont été fortement endommagés par rapport aux acides aminés positionnés dans d'autres sites (Ashkenazy, H et al, 2016). ConSurf prédit que les acides aminés jouent des rôles structurels ou fonctionnels en se basant sur la conservation et l'accessibilité aux solvants. Les résidus sont prédits comme étant fonctionnels lorsqu'ils sont hautement conservés et exposés et structurels lorsqu'ils sont hautement conservés et cachés.

Nous avons utilisé 6 nsSNPs de CTLA-4 identifiés précédemment susceptibles d'être délétères pour analyser leur emplacement dans les régions conservées critiques. Les résultats ont prédit que T147A comme un résidu structurel, ce qui le rend hautement conservé et enfoui, tandis que T72I, N145H, et N145S ont été indiqués comme des résidus fonctionnels, ce qui les rend hautement conservés et exposés. Au contraire, deux nsSNPs a été prédit comme étant enfouis et non fonctionnels (Tableau 3.4), (figure3.5).

Pour la protéine SRC, ConSurf montre le résultat de 7 nsSNPs (P136R, D407N, T460K, P487L, R509W, P510A, P210S) situés dans des régions hautement conservées qui peuvent directement affecter la fonction de la protéine. Aussi il prédit sept nsSNP (G173V, F223L, A296S, A330D, M344L, T432M, M498L) en tant que résidus structurels, ce qui les rend hautement conservés et enfouis, 34 nsSNP ont été prédits comme étant exposés mais non fonctionnels, tandis que 11 nsSNP ont été prédits comme étant enfouis et non fonctionnels. (Figure 3.6).

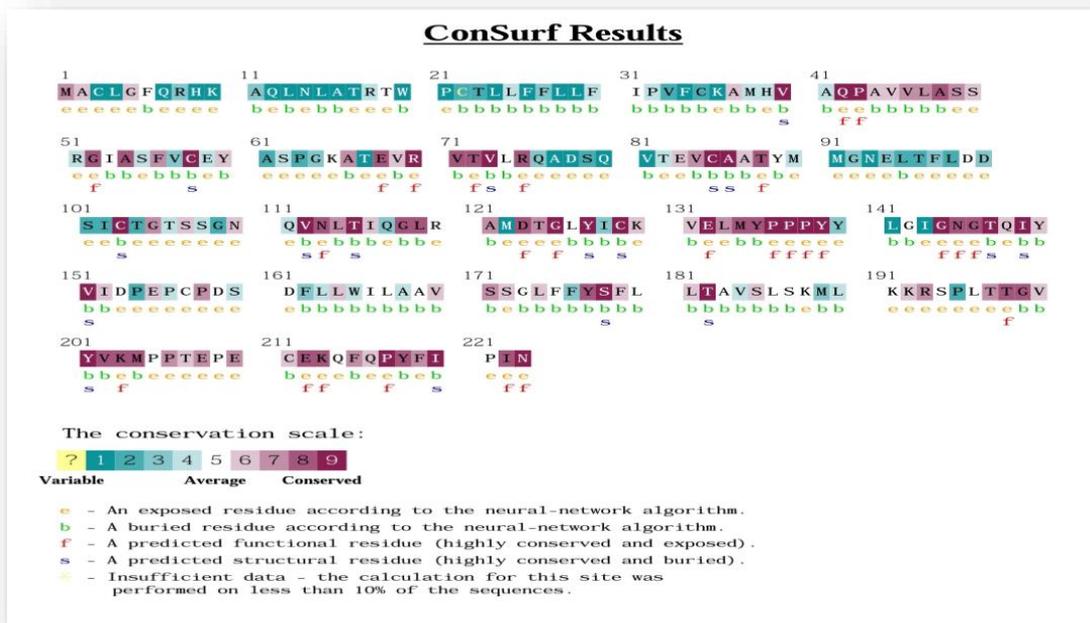


Figure 3.5 : Conservation évolutive de CTLA-4 générée par le serveur web ConSurf

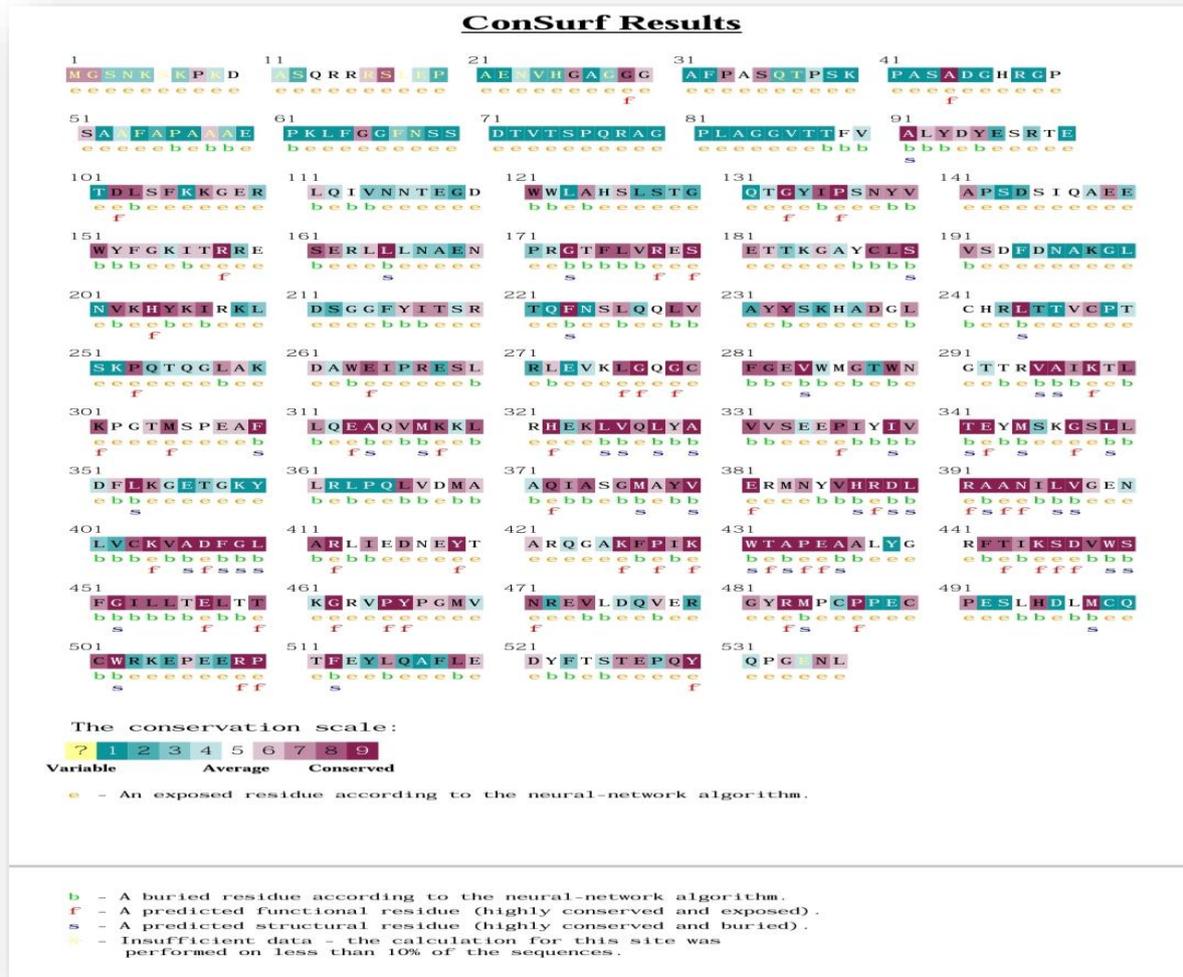


Figure 3.6 : Conservation évolutive de Src générée par le serveur web ConSurf

Tableau 3.4 : Prédiction des nsSNP dans les protéines CTLA-4 et SRC par PMut, I-Mutant 3.0 et ConSurf.

Protein	SNP ID	Mutation	Pmut		I-Mutant 3.0			ConSurf	
			Score and porcentage	Predection	Stability	RI	DDG (kcal /mol)	Conservation Score	Predection
CTLA-4	rs781579729	T72I	0.57 (80%)	Disease	Decrease	1	-0.08	8	Exposed(e) Highly conserved and exposed (f)
	rs764089901	G118R	0.58 (82%)	Disease	Decrease	1	-0.26	8	Buried (b)
	rs1294482526	M134V	0.65 (84%)	Disease	Decrease	6	-0.31	8	Buried (b)
	rs1356678649	N145H	0.62 (83%)	Disease	Decrease	7	-0.33	8	Exposed(e) Highly conserved and exposed (f)
	rs1204026047	N145S	0.62 (83%)	Disease	Decrease	0	-0.21	8	Exposed(e) Highly conserved and exposed (f)
	rs1466152724	T147A	0.87 (91%)	Disease	Decrease	3	-0.80	9	Buried (b) Highly conserved and buried (s)
SRC	Rs1340628132	F105L	0.77 (88%)	Disease	Decrease	4	-1.06	7	Exposed(e)
	Rs772219397	R110W	0.65(84%	Disease	Decrease	5	-0.27	3	Exposed(e)
	Rs762030353	T117I	0.68(85%)	Disease	Decrease	4	-0.25	4	Exposed(e)
	Rs1412626612	P136R	0.92(94%)	Disease	Decrease	8	-1.17	9	Exposed(e) Highly conserved and exposed (f)
	Rs755055234	A141V	0.58(82%)	Disease	Decrease	2	-0.02	6	Exposed(e)
	Rs746439256	W151C	0.92(94%)	Disease	Decrease	7	-1.35	9	Buried (b)
	Rs772598405	G154S	0.65 (84%)	Disease	Decrease	7	-0.97	6	Exposed(e)
	Rs769358602	R159W	0.63 (84%)	Disease	Decrease	6	-0.35	4	Exposed(e)
	Rs1368749598	E162Q	0.58 (82%)	Disease	Decrease	7	-0.48	7	Exposed(e)
	Rs759443292	N170K	0.78 (87%)	Disease	Decrease	5	-0.42	6	Exposed(e)
	Rs1366542593	G173V	0.92 (94%)	Disease	Decrease	3	-0.20	9	Buried (b) Highly conserved and buried (s)
	Rs6018260	L176F	0.73 (87%)	Disease	Decrease	7	-1.12	8	Buried (b)
	Rs143889833	V177M	0.62 (83%)	Disease	Decrease	8	-1.08	7	Buried (b)
	Rs1388458954	T182I	0.8 (89%)	Disease	Decrease	2	-0.09	6	Exposed(e)
	Rs146865960	T183M	0.53 (80%)	Disease	Decrease	1	-0.07	3	Exposed(e)
	Rs75363208	Y187S	0.92 (94%)	Disease	Decrease	8	-1.45	5	Buried (b)
	Rs1198824064	D195N	0.57 (87%)	Disease	Decrease	8	-1.07	4	Exposed(e)
	Rs1458527600	N196Y	0.80 (89%)	Disease	Incérasse	0	0.05	1	Exposed(e)
	Rs7534044366	G199V	0.84 (90%)	Disease	Decrease	8	-0.92	1	Exposed(e)
	Rs368312821	V202L	0.90 (93%)	Disease	Decrease	6	-1.09	8	Buried (b)
Rs867236697	R208H	0.52 (79%)	Disease	Decrease	8	-1.24	5	Exposed(e)	
Rs1289430309	L210V	0.59 (82%)	Disease	Decrease	8	-1.59	3	Exposed(e)	
Rs1478333895	G214C	0.80 (89%)	Disease	Decrease	6	-1.14	4	Exposed(e)	
Rs768609250	R220C	0.74 (87%)	Disease	Decrease	2	-0.73	6	Exposed(e)	
Rs761890358	F223L	0.78 (88%)	Disease	Decrease	5	-0.87	9	Buried (b)	

Résultats et interprétation

									Highly conserved and buried (s)
Rs769916129	S225I	0.53 (84%)	Disease	Incérase	5	0.66	6		Exposed(e)
Rs1466226424	V230A	0.71 (85%)	Disease	Decrease	6	-1.26	7		Buried (b)
Rs149158994	Y232C	0.63 (84%)	Disease	Decrease	2	-0.95	7		Exposed(e)
Rs1433113895	D238N	0.67 (85%)	Disease	Decrease	6	-0.36	7		Exposed(e)
Rs751268997	R243H	0.77 (88%)	Disease	Decrease	6	-0.93	3		Exposed(e)
Rs148049198	R271W	0.82 (90%)	Disease	Decrease	5	-0.13	2		Exposed(e)
Rs754650463	L272P	0.83 (90%)	Disease	Decrease	5	-1.49	6		Buried (b)
Rs766744528	E283k	0.74 (87%)	Disease	Decrease	6	-0.29	7		Exposed(e)
Rs1246093856	N290S	0.63 (84%)	Disease	Increase	4	0.11	6		Exposed(e)
Rs750534584	A296S	0.56 (81%)	Disease	Decrease	5	-0.63	9		Buried (b) Highly conserved and buried (s)
Rs1388365171	T299I	0.56 (81%)	Disease	Decrease	5	-0.16	6		Exposed(e)
Rs956512588	L300P	0.56 (81%)	Disease	Decrease	6	-1.31	8		Buried (b)
Rs1172425959	T304M	0.58 (82%)	Disease	Decrease	0	0.05	6		Exposed(e)
Rs1411658070	Y329C	0.57 (81%)	Disease	Decrease	1	-0.86	6		Buried (b)
Rs1274322227	A330D	0.62 (83%)	Disease	Decrease	3	-0.58	9		Buried (b) Highly conserved and buried (s)
Rs754968435	M344L	0.55 (81%)	Disease	Decrease	7	-0.81	9		Buried (b) Highly conserved and buried (s)
Rs778642449	V367M	0.51 (79%)	Disease	Decrease	4	-0.86	7		Exposed(e)
Rs1181484011	S375L	0.51 (79%)	Disease	Increase	7	0.61	5		Exposed(e)
Rs186207963	D407N	0.56 (81%)	Disease	Decrease	4	-0.89	9		Exposed(e) Highly conserved and exposed (f)
Rs1274078983	E418K	0.51 (79%)	Disease	Decrease	8	-0.63	6		Exposed(e)
Rs142822674	T420M	0.62 (83%)	Disease	Decrease	4	-0.13	5		Exposed(e)
Rs1208655105	G424D	0.67 (85%)	Disease	Decrease	8	-1.18	5		Exposed(e)
Rs1490969287	T432M	0.53 (80%)	Disease	Decrease	2	-0.04	9		Buried (b) Highly conserved and buried (s)
Rs1171125750	T460K	0.52 (79%)	Disease	Decrease	6	-0.63	8		Exposed(e) Highly conserved and exposed (f)
Rs1420046989	V478M	0.56 (81%)	Disease	Decrease	8	-1.02	6		Buried (b)
Rs1317072077	P485L	0.56 (81%)	Disease	Decrease	1	-0.08	5		Exposed(e)
Rs756665933	P487L	0.55 (81%)	Disease	Decrease	2	-0.15	9		Exposed(e) Highly conserved and exposed (f)
Rs769834016	L497F	0.55 (81%)	Disease	Decrease	2	-0.63	5		Buried (b)
Rs1344423676	M498L	0.50 (79%)	Disease	Decrease	5	-0.47	9		Buried (b) Highly conserved and buried (s)
Rs564099857	R503W	0.65 (84%)	Disease	Decrease	5	-0.04	2		Exposed(e)
Rs1159129326	P506S	0.57 (81%)	Disease	Decrease	6	-1.14	6		Exposed(e)
Rs13053388441	R509W	0.65 (84%)	Disease	Decrease	3	0.03	9		Exposed(e) Highly conserved and exposed (f)

Rs1346524802	P510A	0.62 (83%)	Disease	Decrease	8	-0.87	9	Exposed(e) Highly conserved and exposed (f)
Rs1346524802	P510S	0.62 (83%)	Disease	Decrease	7	-1.21	9	Exposed(e) Highly conserved and exposed (f)

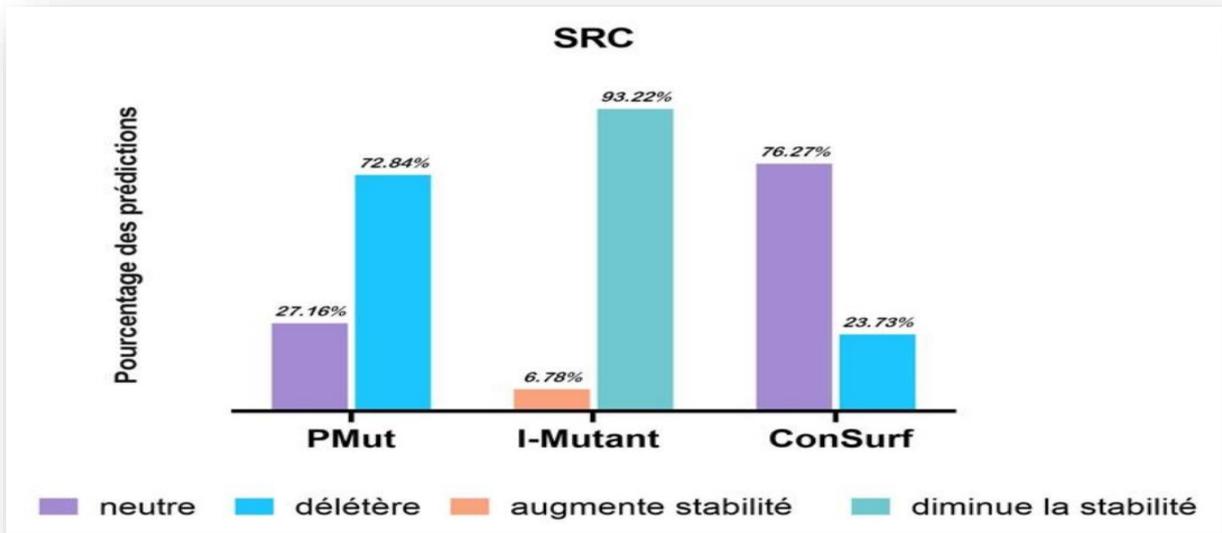


Figure 3.7 : Distribution des nsSNPs dans le gène SRC basée sur les effets estimés prédits par divers outils structurels.

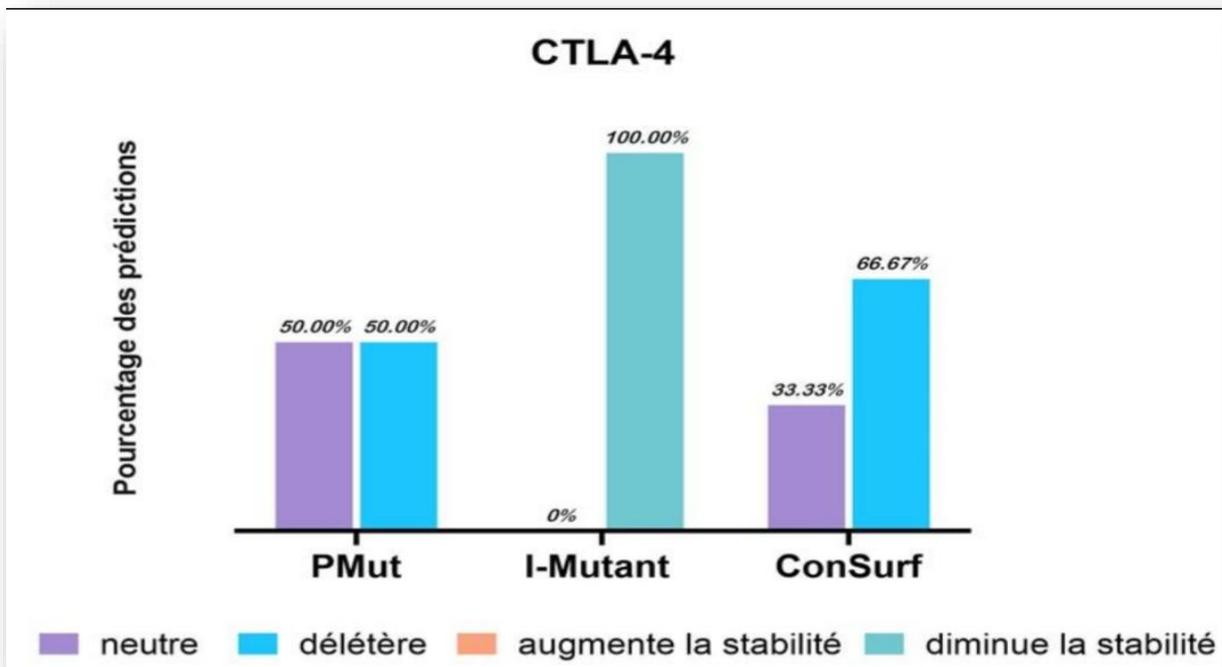


Figure 3.8 : Distribution des nsSNPs dans le gène CTLA-4 basée sur les effets estimés prédits par divers outils structurels.

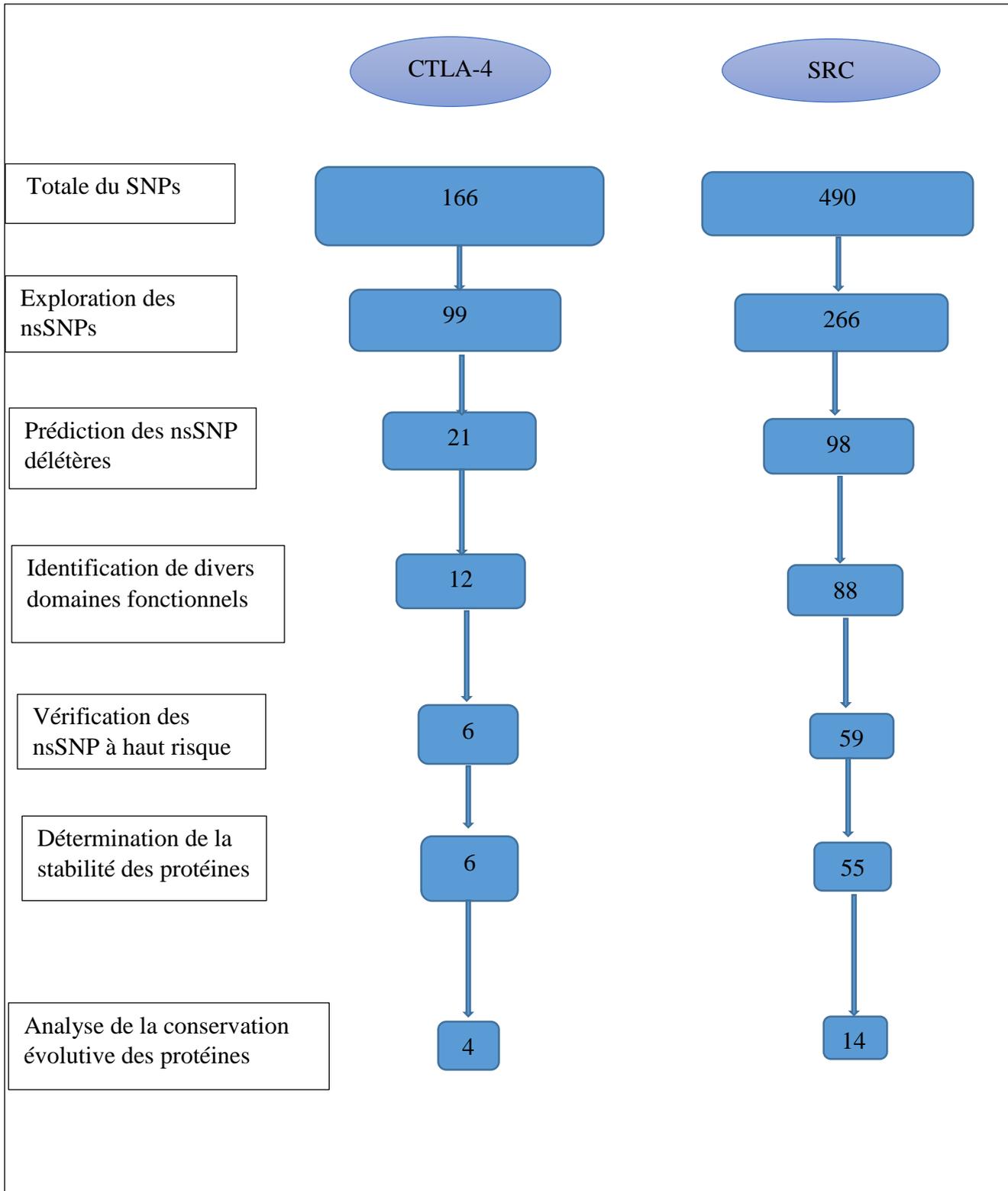


Figure 3.9 : analyse in silico des SNPs fonctionnelles sur CTLA-4 et SRC

Sur un total de 166 nsSNPs pour le gène CTLA-4 et 490 pour le gène SRC, il y a 99 nsSNPs de CTLA-4 et 266 nsSNPs de SRC. Parmi ces SNPs nous avons finalement sélectionné les nsSNPs fortement délétères (21 nsSNPs pour CTLA-4 et 98 nsSNPs pour SRC) en utilisant cinq outils de prédiction *in silico* des SNPs : SIFT, Polyphen-2, PROVEAN, SNAP2, PANTHER. Nous avons également utilisé l'outil InterPro pour déterminer la localisation de ces nsSNPs sur différents domaines des protéines étudiés. Il a détecté 12 nsSNPs dans le domaine fonctionnel (Ig_sub) de la protéine CTLA-4. Aussi il a montré 88 nsSNPs dans trois domaines différents de la protéine SRC, où 55 nsSNPs étaient positionnés dans le domaine de Prot-Kinase-dom, 27 nsSNPs étaient situés dans le domaine SH2, et les six (6) nsSNPs restants étaient présents dans SH3-domain.

Ensuite ils ont été soumis à l'analyse fonctionnelle par PMut qui permet la prédiction de six (6) nsSNPs de CTLA-4 et 59 nsSNPs de SRC susceptibles d'être responsables de la maladie.

En utilisant l'outil I-Mutant 3.0 pour l'analyse de la stabilité des protéines, nous avons obtenu les nsSNPs délétères qui peuvent affecter la stabilité des protéines étudiés. Tous les six nsSNPs du CTLA-4 et parmi les 59 nsSNPs du SRC, 55 nsSNPs ont diminué la stabilité de ces protéines.

Quatre nsSNPs de CTLA-4 ont été identifiés comme étant hautement conservés par ConSurf avec un score de conservation de 8, tandis que 14 nsSNPs du gène SRC avec des scores de conservation entre 8 et 9 étaient situés dans des régions hautement conservées (**Figure 3.9**).

CHAPITRE IV : DISCUSSION

IV. Discussion

Les variantes génétiques peuvent affecter l'expression du récepteur CTLA-4, entraînant des différences entre les individus dans la susceptibilité au CCR. Il a été suggéré que des polymorphismes du gène CTLA-4 pourrait entraîner une production plus élevée de CTLA-4, entraînant une inhibition plus forte de l'activation des cellules T et, par conséquent, une perte de l'effet antitumoral (**Cozar JM et al, 2007**).

La Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src est impliquée dans la pathogenèse du CCR son activation favorise la prolifération des cellules du CCR, les métastases vers d'autres organes et la formation de cellules souches cancéreuses (CSC) (**Wook Jin, 2020**).

Cette étude a permis d'identifier des nsSNPs les plus dommageables et leurs effets sur la structure et la fonction des protéines CTLA-4 et SRC afin de comprendre leur association avec le cancer colorectal humain en utilisant des approches *in silico*.

Un total de 166 SNPs ont été extraits de la base de données dbSNP du NCBI pour le gène CTLA-4 et 490 pour le gène SRC, et parmi ces SNPs il y a 99 nsSNPs de CTLA-4 et 266 nsSNPs de SRC. Parmi ces SNPs nous avons finalement sélectionné les nsSNPs fortement délétères (21 nsSNPs pour CTLA-4 et 98 nsSNPs pour SRC). Ces nsSNPs délétères ont été sélectionnés sur la base des scores de prédiction générés par ces cinq outils ou d'au moins quatre outils. Nous avons également déterminé la localisation de ces nsSNPs sur différents domaines des protéines étudiés. 12 nsSNPs ont été détectés dans le domaine fonctionnel (Ig_sub) de la protéine CTLA-4. Aussi 88 nsSNPs ont été détectés dans trois domaines différents de la protéine SRC, où 55 nsSNPs étaient positionnés dans le domaine de Prot-Kinase-dom, 27 nsSNPs étaient situés dans le domaine SH2, et les 6 nsSNPs restants étaient présents dans SH3-domain. A partir de ce résultats, 6 nsSNPs de CTLA-4 et 59 nsSNPs de SRC susceptibles d'être responsables de la maladie.

La stabilité des protéines est l'une des caractéristiques clés pour déterminer si une protéine est biologiquement active et fonctionnelle (**Gromiha, M. M, 2010**). Les protéines dont la stabilité est réduite en raison d'une mutation peuvent donner lieu à une tumorigénèse, car le niveau d'aptitude des protéines normales diminue et confère de l'aptitude aux protéines tumorigènes (**Wilcken, R et al, 2012**). En utilisant l'outil I-Mutant 3.0, nous avons obtenu les nsSNPs délétères qui peuvent affecter la stabilité des protéines étudiés. Tous les six nsSNPs du CTLA-4 et parmi les 59 nsSNPs du SRC, 55 nsSNPs ont diminué la stabilité de ces protéines. La stabilité de la protéine régule la structure conformationnelle de la protéine et détermine ainsi sa

fonction. Toute altération de la stabilité de la protéine peut provoquer un mauvais repliement, une dégradation ou un agrégat aberrant des protéines (**Witham, S et al, 2011**).

De plus, la conservation évolutive de la séquence de la protéine est essentielle pour déterminer si une mutation a un effet négatif sur l'hôte. La conservation évolutive des résidus des protéines a été calculée à l'aide de ConSurf. La conservation d'un acide aminé au cours de l'évolution indique sa sensibilité naturelle à la mutation. On peut supposer que les acides aminés hautement conservés et exposés qui subissent des mutations sont les plus délétères (**Ashkenazy, H et al, 2016**). Quatre nsSNPs de CTLA-4 ont été identifiés comme étant hautement conservés par ConSurf avec un score de conservation de 8, tandis que 14 nsSNPs du gène SRC avec des scores de conservation entre 8 et 9 étaient situés dans des régions hautement conservées. Par conséquent, ils augmentent le risque de tumorigenèse.

CHAPITRE V :
CONCLUSION ET
PERSPECTIVES

V. Conclusion et perspectives

L'étude actuelle a examiné les effets des SNPs fonctionnels associés aux gènes CTLA-4 et SRC humain par des méthodes computationnelles en raison de la relation de ces gènes avec le cancer colorectal.

La présente étude suggère que la fonction des protéines CTLA-4 et Src pourraient être perturbées par divers SNP non synonyme. Ces nsSNPs peuvent être considérés comme des cibles principales dans la cause de maladies telles que le cancer colorectal.

Sur un total de, 99 SNPs du gène CTLA-4 et 266 SNPs du gène SRC, 4 nsSNPs CTAL-4 et 14 nsSNPs SRC ont été considérés comme pathogènes à haut risque par l'ensemble des outils bioinformatiques utilisés dans cette étude. Nous supposons que les résultats de la présente étude constituent une base pour de futures études expérimentales et *in silico*.

Nos résultats serviront comme guide important pour d'autres analyses structurelle permettant de prédire les interactions protéine-protéine ou protéine-peptide ainsi que les modifications post-traductionnelles.

CHAPITRE VI : ***BIBLIOGRAPHIE***

Bibliographie :**A**

- ABES Fatiha, ADJAOUTI Zahia, BELAIDI Melissa le 15-09-2015. Etude rétrospective et prospective du cancer colorectal en général et de la thérapie ciblée impliquée dans son traitement en particulier.
- Abderrahmane, at ALL (2015). TP53 Arg 72Pro, MDM2 SNP309 polymorphisms, and colorectal cancer risk: a west Algerian population study.
- Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR (2013) Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet.* 76(1):7–20
- Afshin Derakhshani et al, Antigène-4-des lymphocytes T cytotoxiques dans le cancer colorectal : un autre côté thérapeutique de la capécitabine .17/05/2021).
- Altshuler D, Pollara VJ, Cowles CR, Van Etten WJ, Baldwin J, Linton L, et al. An SNP map of the human genome generated by reduced representation shotgun sequencing. *Nature.* 2000.
- Ashkenazy, H., Abadi, S., Martz, E., Chay, O., Mayrose, I., Pupko, T., Ben-Tal, N., 2016. ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Res.* 44, W344–W350. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw408>
- Alan Barkun et al ; 2007. Survivre au cancer colorectal.
- Al-Haggar M, Madej-Pilarczyk A, Kozłowski L, Bujnicki JM, Yahia S, Abdel-Hadi D, Shams A, Ahmad N, Hamed S, Puzianowska-Kuznicka M (November 2012). "A novel homozygous p.Arg527Leu LMNA mutation in two unrelated Egyptian families causes overlapping mandibuloacral dysplasia and progeria syndrome
- Amal Ahmed Abd El-Fattah,1 Nermin Abdel Hamid Sadik,1 Olfat Gamil Shaker ,2 and Amal Mohamed Kamal, 2018 Single Nucleotide Polymorphism in SMAD7 and CHI3L1 and Colorectal Cancer Risk.
- Apweiler, R. et al. The InterPro database, an integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites. *Nucleic Acids Res.* 29, 37–40 (2001).

B

- Belhamidi, M. S., Sinaa, M., Kaoukabi, A., Krimou, H., Menfaa, M., Sakit, F., & Choho, A. (2018). Profil épidémiologique et anatomopathologique du cancer colorectal : à propos de 36 caswe.
- Bernard CHINA, Antoine CLINQUART, Georges DAUBE, 2004
- Bluestone, J. A. 1997. Is CTLA-4 a master switch for peripheral T cell tolerance? *J. Immunol.* 158: 1989.
- Brenda Udosen, Opeyemi Soremekun1, Chinwe Ekenna, Olaposi Idowu Omotuyi, Tinashe Chikowore, Oyekanmi Nashiru and Segun Fatumo, 2021. In-silico analysis reveals druggable single nucleotide polymorphisms in angiotensin 1 converting enzyme involved in the onset of blood pressure

- Brunham LR, Singaraja RR, Pape TD, Kejariwal A, Thomas PD, et al. (2005) Accurate prediction of the functional significance of single nucleotide polymorphisms and mutations in the ABCA1 gene. *PLoS Genet* 1: e83. PMID: 16429166
- Boyle, P., Langman JS. (2000) Epidemiology- ABC of colorectal cancer. *Br Med*.
- Bromberg Y, Rost B (2007) SNAP: predict effect of non-synonymous polymorphisms on function. *Nucleic Acids Res.* 35(11):3823–3835
- Browning M, Petronzelli F, Bicknell D, et al. Mechanisms of loss of HLA class I expression on colorectal tumor cells. *Tissue Antigens* 1996 ; 47 : 364-71.
- 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*

C

- Cady B, Stone M, 1991. The role of surgical resection of liver metastases in colorectal carcinoma.
- Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 2002.
- Chava Kimchi-Sarfaty, Jung Mi Oh, In-Wha Kim, Zuben E. Sauna, Anna Maria Calcagno, Suresh V. Ambudkar, Michael M. Gottesman†, 2007, A “Silent” Polymorphism in the MDR1 Gene Changes Substrate Specificity.
- Chambers, C. A., J. P. Allison. 1997. Co-stimulation in T cell responses. *Curr. Opin. Immunol*
- Cozar JM, Romero JM, Aptsiauri N, Vazquez F, Vilchez JR, Tallada M, Garrido F and Ruiz-Cabello F: High incidence of CTLA-4 AA (CT60) polymorphism in renal cell cancer. *Hum Immunol* 68(8): 698-704, 2007. PMID: 17678726. DOI: 10.1016/j.humimm.2007.05.002
- Chen Zou, et al, 2018 CTLA4 tagging polymorphisms and risk of colorectal cancer: a case–control study involving 2,306 subjects.
- Cherfaoui khaled en 2017. Étude épidémiologique génétique histopathologique des cancers colorectaux.
- Chikuma S, Imboden JB, Bluestone JA. Negative regulation of T cell receptor-lipid raft interaction by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med.* 2003.
- Chong YP, Mulhern TD, Cheng HC. C-terminal Src kinase (csk) and cskhomologous kinase (chk)—endogenous negative regulators of Src-family protein kinases. *Growth Factors* 2005; 23:233-44
- Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP (2012) Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One.* 7 (10):e46688)
- Chuang, E., K. Lee, M. D. Robbins, J. M. Duerr, M. Alegre, J. E. Hambor, M. J. Neveu, J. A. Bluestone, C. B. Thompson. 1999. Regulation of cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 by Src kinases.
- Collins AV, Brodie DW, Gilbert RJC, Iaboni A, Manso-Sancho R, Walse B, et al. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity.* 2002 Aug;17(2):201–10.

- Cramer CJ. Essentials of computational chemistry: theories and models. Wiley, 2e édition, 2004.
- Cordovado SK, Hendrix M, Greene CN, Mochal S, Earley MC, Farrell PM, Kharrazi M, Hannon WH, Mueller PW (février 2012). "Analyse des mutations CFTR et associations d'haplotypes chez les patients atteints de mucoviscidose"

D

- Daly-schveitzer N et al, (2003). Cancérologie clinique.
- Daly, Ann K (2017-10-11). Pharmacogénétique : un examen général des progrès accomplis à ce jour
- Dr Stéphane Champaint, 12/2016. Surveillance immunitaire antitumorale.
- Dr. HASSAINE mohamed Said en 2012. CANCERS COLORECTAUX.

E

- Eberle MA, Ng PC, Kuhn K, Zhou L, Peiffer DA, Galver L, et al. Power to detect risk alleles using genome-wide tag SNP panels. PLoS genetics. 2007.
- Emambux, Sheik, Gaelle Tachon, Audelaure Junca, et David Tougeron. 2018. « Results and Challenges of Immune Checkpoint Inhibitors in Colorectal Cancer ». Expert Opinion on Biological Therapy.
- Elodie GUILLEMOT le 2 Décembre 2013. Étude des couples Chimiokines/Récepteurs comme nouvelles cibles thérapeutiques des cancers colorectaux métastasés : études précliniques.
- Etude de l'association des éléments de traces et le cancer colorectal chez le sujet algérienne : Recherche des facteurs de risques.
- Esch, A et All (2012). Existe-t-il une alternative à la chimiothérapie adjuvante par FOLFOX dans les cancers coliques de stade III ?

F

- Faivre, J., Lepage, C., & Viguié, J. (2009). Cancer colorectal : Du diagnostic au dépistage. Gastroentérologie clinique et biologique.
- Ferrer-Costa, C., Gelpí, J.L., Zamakola, L., Parraga, I., De La Cruz, X., Orozco, M., 2005. PMUT: a web-based tool for the annotation of pathological mutations on proteins. Bioinformatics 21, 3176–3178.
- Fearon E.R., Vogelstein B, 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis Cell.
- Feltus FA, Wan J, Schulze SR, Estill JC, Jiang N, Paterson AH. An SNP resource for rice genetics and breeding based on subspecies indica and japonica genome alignments. Genome research. 2004.
- Flint-Garcia SA, Thornsberry JM, Buckler ESt. Structure of linkage disequilibrium in plants. Annual review of plant biology. 2003.
- François Ghiringhelli, janvier-février-mars 2013, surveillance immune antitumorale et échappement.

- F. S. Collins, L. D. Brooks, and A. Chakravarti, "A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation," *Genome Research*, vol. 8, no. 12, pp. 1229–1231, 1998.

G

- Ghaderi, A. (2011). CTLA4 gene variants in autoimmunity and cancer: a comparative review. *Iran J Immunol*.
- Gromiha, M. M. *Protein Bioinformatics: From Sequence to Function* (Academic Press, 2010)
- Guntermann C, Alexander DR: CTLA-4 suppresses proximal TCR signaling in resting human CD4(+) T cells by inhibiting ZAP-70 Tyr(319) phosphorylation: a potential role for tyrosine phosphatases. *J Immunol* 2002.

H

- Harini Venkata Subbiah¹, Polani Ramesh Babu² and Usha Subbiah, 2020. In silico analysis of non-synonymous single nucleotide polymorphisms of human DEFB1 gene
- 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.
- Hecht, M., Bromberg, Y., Rost, B., 2015. Better prediction of functional effects for sequence variants. *BMC Genomics* 16 (Suppl 8), S1. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-16-S8-S1>.
- Hillier LW, Miller RD, Baird SE, Chinwalla A, Fulton LA, Koboldt DC, et al. Comparison of *C. elegans* and *C. briggsae* genome sequences reveals extensive conservation of chromosome organization and synteny. *PLoS biology*. 2007.
- Hunter, S. et al. InterPro in 2011: new developments in the family and domain prediction database. *Nucleic Acids Res.* 40, D306–D312 (2011).
- HOWARD R.A, et al. (2008, November). Physical activity, sedentary behavior, and the risk of colon and rectal cancer in the NIH-AARP Diet and - Health Study. *Cancer Causes & Control*.

I

- Irby, RB, Mao, W., Coppola, D., Kang, J., Loubeau, JM, Trudeau, W., Karl, R., Fujita, DJ, Jove, R., Yeatman, TJ. Activation of the SRC mutation in a subset of advanced human colon cancers *Nature Genet.* 21 : 187-190, 1999.

J

- Jacques Ferlay, et al *Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*.
- James T.L. Mah, Esther S.H. Low and Edmund Lee, 2011, In silico SNP analysis and bioinformatics tools: a review of the state of the art to aid drug discovery.
- JASS. (2002) Emerging concepts in colorectal neoplasia.
- Jesus Cardenas, 16/09/2016. Les traitements du cancer colorectal.

K

- Keogh E, Fikes J, Southwood S, Celis E, Chesnut R, Sette A. Identification of new epitopes from four different tumor-associated antigens: recognition of naturally processed epitopes correlates with HLA* 0201-binding affinity. *J Immunol* 2001.
- Kubsch S, Graulich E, Knop J, Steinbrink K: Suppressor activity of anergic T cells induced by IL-10-treated human dendritic cells: association with IL-2- and CTLA-4-dependent G1 arrest of the cell cycle regulated by p27Kip1. *Eur J Immunol* 2003.
- 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

- Lafay L et al. Alimentation et cancer colorectal .23/05/2016
- LARIBI A, RABAHI K. Etude in-silico de l'inhibition de la Xanthine oxydase: Université de Bouira; 2017.
- Lee, K., E. Chuang, M. Griffin, R. Khattri, D. K. Hong, W. Zhang, D. Straus, L. E. Samelson, C. B. Thompson, J. A. Bluestone. 1998. Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4
- 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.
- Li D, Gál I, Vermes C, Alegre ML, Chong AS, Chen L, Shao Q, Adarichev V, Xu X, Koreny T, Mikecz K, Finnegan A, Glant TT, Zhang J: Cutting edge: Cbl-b: one of the key molecules tuning CD28- and CTLA-4-mediated T cell costimulation. *J Immunol* 2004.
- LIVIERE A et al. Mécanismes de la cancérogenèse. colorectale 2004.
- L - J. Lamrani. Tumeur coliques en occlusion. Thèse de doctorat, 2008.
- Loubna Allam (05/02/2020), Conception et évaluation des molécules anticancéreuses par approches in silico.
- López-Ferrando, V., Gazzo, A., De La Cruz, X., Orozco, M. & Gelpí, J. L. PMut: web-based tool for the annotation of pathological variants on proteins, 2017 update. *Nucleic Acids Res.* 45, W222–W228 (2017).
- Loubna ALLAM, 2020, Conception et évaluation des molécules anticancéreuses par approches in silico Inhibiteurs des Kinases AKT1 et LMTK3.
- Lu YF, Mauger DM, Goldstein DB, Urban TJ, Weeks KM, Bradrick SS (novembre 2015). "La structure de l'ARNm de l'IFNL3 est remodelée par un polymorphisme non codant fonctionnel associé à la clairance du virus de l'hépatite C"

M

- Markman, Janet L., et Stephen L. Shiao. 2015. « Impact of the Immune System and Immunotherapy in Colorectal Cancer ». *Journal of Gastrointestinal Oncology*.

- Martin M, Schneider H, Azouz A, Rudd CE. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 and CD28 modulate cell surface raft expression in their regulation of T cell function. *J Exp Med.* 2001.
- Marengere, L. E., P. Waterhouse, G. S. Duncan, H. W. Mittrucker, G. S. Feng, and T. W. Mak. 1996. Regulation of T cell receptor signaling by tyrosine phosphatase SYP association with CTLA-4. 1996
- Massagué, Joan. 2008. « TGF β in Cancer ». *Cell.*
- Med Sci, Octobre 2011. Rôle de CTLA4 dans la cosignalisation négative du système immunitaire.
- Miren L. Baroja, Deborah Luxenberg, Thu Chau, Vincent Ling, Craig A. Strathdee, Beatriz M. Carreno and Joaquín Madrenas, 2000. The Inhibitory Function of CTLA-4 Does Not Require Its Tyrosine Phosphorylation
- Michel Ducreux. *Cancer colorectal.* 27/04/2021.
- Michel Ducreux, aout 2014, le cancer colorectal.
- Miller, M.P. and Kumar, S. (2001) Understanding human disease mutations through The use of interspecific genetic variation. *Hum. Mol.*
- Molineris I, Schiavone D, Rosa F, Matullo G, Poli V, Provero P. Identification des polymorphismes cis-régulateurs fonctionnels dans le génome humain. *Mutations Humaines* . 2013
- Mohammed Nimir et al, 2017, In silico analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in human FOXC2 gene [version 2; referees: 2 approved].

N

- Nackley AG, Shabalina SA, Tchivileva IE, et al. Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. *Science* 2006
- Ng PC, Henikoff S (2002) Accounting for human polymorphisms predicted to affect protein function. *Genome Res.* 12(3): 436–446 7-9
- Ng PC, Henikoff S (2001) Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res.* 11(5):863–874
- Nguyen, H. T., & Duong, H. Q. (2018). The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy. *Oncology letters*, 16(1), 9-18.

O

- Olivier et all. (2011). Signalisation et prédispositions métaboliques liées au cancer colorectal.
- Olsson C, Riesbeck K, Dohlsten M, Michaëlsson E, Riebeck K: CTLA-4 ligation suppresses CD28-induced NF κ B and AP-1 activity in mouse T cell blasts. *J Biol Chem* 1999.

P

- Parente S. (2010). Diagnostic moléculaire des cancers colorectaux métastatiques : Facteurs prédictifs de réponse aux thérapies ciblées anti-EGFR et organisation du

génotypage KRAS en Lorraine. Thèse doctorat Université Henri Poincaré – Nancy, 1 29.R.

- Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV, Linsley PS, Thompson CB, Riley JL: CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* 2005.
- Pascal Pujol. Prédilection génétique au cancer et hérédité. 12/11/2018.
- Picard-Croguennec, M. (2018). Le cancer colorectal, physiopathologie et principaux symptômes.
- Pietge, H., Rickenbacher, A., Turina, M., & Misselwitz, B. (2017, October). Le cancer colorectal.
- polymorphisme CTLA-4 +49A>G est associé au risque mais pas à la progression du cancer colorectal chez Chinois. *Int J Colorectal Dis* 2010.

Q

- Qi P, Ruan CP, Wang H, Zhou FG, Xu XY, Gu X, Zhao YP, Dou TH, Gao CF : le polymorphisme CTLA-4 +49A>G est associé au risque mais pas à la progression du cancer colorectal chez Chinois. *Int J Colorectal Dis* 2010;25:39-45.

R

- Ramensky, V., Bork, P., Sunyaev, S., 2002. Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res.* 30, 3894–3900
- Rowshanravan, B., Halliday, N., and Sansom, D.M. (2018). CTLA-4: a moving target in immunotherapy.

S

- Sabel MS, Hess SD, Egilmez NK, Conway TF, Chen FA, Bankert RB: CTLA-4 blockade augments human T lymphocyte-mediated suppression of lung tumor xenografts in SCID mice. *Cancer Immunol Immunother* 2005;54:944-952.
- Schaub MA, Boyle AP, Kundaje A, Batzoglou S, Snyder M. Relier les associations de maladies aux informations réglementaires dans le génome humain. *Recherche sur le génome* . 2012
- Scheipers P, Reiser H. : Fas-independent death of activated CD4(+) T Lymphocytes Induced by CTLA-4 cross linking. *proc natl acad sci USA* 1998.
- Sherry ST, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(1):308–11. <https://doi.org/10.1093/nar/29.1.308>
- Schneider H, Smith X, Liu H, Bismuth G, Rudd CE. CTLA-4 disrupts ZAP70 microcluster formation with reduced T cell/APC dwell times and calcium mobilization. *Eur J Immunol.* 2008
- Schneider H, Valk E, Leung R, Rudd CE. CTLA-4 activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K) and protein kinase B (PKB/AKT) sustains T-cell anergy without cell death. *PLoS One.* 2008
- Schneider H, Mandelbrot DA, Greenwald RJ, Ng F, Lechler R, Sharpe AH, et al. Cutting Edge: CTLA-4 (CD152) Differentially Regulates Mitogen-Activated Protein

Kinases (Extracellular Signal-Regulated Kinase and c-Jun N-Terminal Kinase) in CD4+ T Cells from Receptor/Ligand-Deficient Mice. *J Immunol.* 2002.

- Schneider, H., K. V. Prasad, S. E. Shoelson, C. E. Rudd. 1995. CTLA-4 binding to the lipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase in T cells
- Schmid KJ, Sorensen TR, Stracke R, Torjek O, Altmann T, Mitchell-Olds T, et al. Large-scale identification and analysis of genome-wide single-nucleotide polymorphisms for mapping in *Arabidopsis thaliana*. *Genome research.* 2003.
- Shen LX, Babilion JP, Stanton VP. Single-nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ; 96 : 7871–7876
- Sylvia Korzeniewski, Paul Hofman et Patrick Brest, 201. Des polymorphismes silencieux plutôt bruyants Noisy silent polymorphisms
- S. Paul et al, 2016. Immunotherapy in metastatic colorectal cancer.
- Sim N-L, Kumar P, Hu J, Henikoff S, Schneider G, Ng PC (2012) SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res.* 40(W1):W452–W457 7
- Sobrino B, Brion M, Carracedo A. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Sci Int.* 2005;154(2-3):181-94
- Sunyaev, S. et al. (2000) Towards a structural basis of human non-synonymous single nucleotide polymorphisms.
- Svrcek, M., Cervera, P., Hamelin, R., Lascols, O., Duval, A., & Fléjou, J. F. (2011). Cancer colorectal: les nouveaux rôles du pathologiste à l'ère de la biologie.

T

- Tariq, K., & Ghias, K. (2016). Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer biology & medicine.*
- Teft WA, Kirchhof MG, Madrenas J, 2006. A molecular perspective on CTLA-4 function. *Annu Rev Immunol.*
- Thomas Walter et al, 2016. Les différentes classes de thérapies ciblées.
- Thomas Aparicido(2018), Immunothérapie dans les cancers digestifs.
- Thomas , A. Kejariwal Codage des polymorphismes mononucléotidiques associés à la maladie complexe vs mendélienne : preuves évolutives des différences dans les effets moléculaires *Proc. Natl. Acad. Sci. États- Unis*, 101 (2004) , p. 15398 – 15403.
-
- Tougeron D, Fauquembergue É, Latouche JB. Réponse immunitaire et cancers colorectaux. *Bull Cancer* 2013.

V

- Van der Burg SH, de Cock K, Menon AG, et al. Long lasting p53-specific T cell memory responses in the absence of anti-p53 antibodies in patients with resected primary colorectal cancer. *Eur J Immunol* 2001.

W

- Walker LSK, Sansom DM. Confusing signals: Recent progress in CTLA-4 biology. *Trends Immunol.* févr 2015
- Wang C, Liu Z. Arabidopsis ribonucleotide reductases are critical for cell cycle progression, DNA damage repair, and plant development. *The Plant cell.* 2006.
- Wang, Z. and Moulton, J. (2001) SNPs, protein structure, and disease.
- Wilcken, R., Wang, G., Boeckler, F. M. & Fersht, A. R. Kinetic mechanism of p53 oncogenic mutant aggregation and its inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 13584–13589 (2012)
- Witham, S., Takano, K., Schwartz, C. & Alexov, E. A missense mutation in CLIC2 associated with intellectual disability is predicted by in silico modeling to affect protein stability and dynamics. *Proteins Struct. Funct. Bioinform.* 79, 2444–2454 (2011)
- Wolchok JD, Saenger Y: The mechanism of anti-CTLA-4 activity and the negative regulation of T-cell activation. *Oncologist* 2008;13 Suppl 4:2-9.
- Wook Jin, 2020. Regulation of Src Family Kinases during Colorectal Cancer Development and Its Clinical Implications.

Y

- Yeatman TJ. A renaissance for Src. *Nat Rev Cancer* 2004 ; 4:470-80.
- Yokosuka T, Kobayashi W, Takamatsu M, Sakata-Sogawa K, Zeng H, Hashimoto-Tane A, et al. Spatiotemporal basis of CTLA-4 costimulatory molecule-mediated negative regulation of T cell activation. *Immunity.* 2010 Sep 24.
- Yu-Ching Weng et al, 2005: CT60 Single Nucleotide Polymorphism of The CTLA-4 Gene Is Associated with Susceptibility to Graves' disease In the Taiwanese Population. *Annals of Clinical & Laboratory Science.*

Z

- Zitvogel L, Galluzzi L, Smyth MJ, Kroemer G. Mechanism of action of conventional and targeted anticancer therapies: reinstating immunosurveillance. *Immunity* 2013.
- Zitvogel, L., Tesniere, A., and Kroemer, G. (2006). Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 715–72

ANNEXES

Annexe 01 : prédiction des nsSNPs dans CTLA-4 par des outils bioinformatique

dbSNPrs# cluster id	Amino acid	SIFT prediction	SIFT score	MSC	Polyphene prediction	Polyphene score	Provean prediction	Provean score	SNAP prediction	SNAP	Panther prediction	Pdel
rs767352 102	A2S	Deleterious	0.00	4.32	Possibly damaging	0.823	Neutral	-0.531	Neutral	-90	probably benign	0.27
rs128940 8071	C3F	Tolerated	0.22	4.32	Benign	0.086	Neutral	-1.077	neutral	-30	probably benign	0.27
rs896306 346	F6I	Tolerated	0.12	4.32	Benign	0.005	Neutral	-0.769	effect	24	probably benign	0.27
rs201778 935	R8W	Deleterious	0.01	4.32	Possibly damaging	0.009	Neutral	-1.949	effect	87	possibly damaging	0.5
rs138279 736	R8Q	Tolerated	0.10	4.32	Probably damaging	0.982	Neutral	-1.949	effect	39	possibly damaging	0.5
	R8L	Tolerated	0.05	4.32	Probably damaging	0.961	Neutral	-1.474	effect	65	possibly damaging	0.5
rs146541 851	K10E	Tolerated	0.31	4.32	Benign	0.000	Neutral	-0.315	effect	50	probably benign	0.19
rs148495 4450	A11G	Tolerated	0.06	4.32	Benign	0.002	Neutral	-0.607	effect	25	probably benign	0.27
rs748599 835	A16T	Tolerated	0.54	4.32	Benign	0.001	Neutral	-0.253	neutral	-46	probably benign	0.27
rs772433 747	A16D	Tolerated	0.15	4.32	Benign	0.242	Neutral	-0.786	effect	38	probably benign	0.27
rs148410 9503	T17S	Tolerated	1.00	4.32	Benign	0.000	Neutral	0.241	neutral	-62	probably benign	0.19
rs132384 1915	T19I	Deleterious	0.00	4.32	Benign	0.265	Neutral	-1.245	effect	66	probably benign	0.27
rs769368 847	W20 L	Deleterious	0.00	4.32	Possibly Damging	0.941	Deleterious	-2.615	effect	31	probably damaging	0.57
rs104111 7695	P21R	Deleterious	0.02	4.32	Possibly Damaging	0.846	Neutral	-2.013	effect	54	possibly damaging	0.5
rs136582 9864	T23I	Tolerated	0.23	4.32	Possibly Damaging	0.734	Neutral	-0.969	effect	24	probably benign	0.27
rs128095 1195	L25P	Deleterious	0.00	3.33	Probaly Damaging	0.991	Neutral	-2.232	effect	47	probably benign	0.27

rs748802696	F26S	Deleterious	0.03	3.33	Benign	0.011	Neutral	-1.104	effect	9	probably benign	0.27
rs774434261	I31V	Tolerated	0.15	3.32	Benign	0.010	Neutral	-0.272	neutral	-61	probably benign	0.27
rs369567630	P32S	Tolerated	0.05	3.32	Benign	0.232	Neutral	-2.006	neutral	-1	possibly damaging	0.5
rs1413571467	P32L	Deleterious	0.01	3.32	Benign	0.002	Neutral	-2.033	neutral	-1	possibly damaging	0.5
rs1293454690	H39P	Tolerated	0.25	3.32	Probably Damaging	0.979	Neutral	-1.887	Effect	49	probably benign	0.27
rs766143912	V46I	Tolerated	0.20	3.12	Benign	0.113	Neutral	-0.063	neutral	-15	probably benign	0.27
rs759766975	R51Q	Tolerated	0.17	3.12	Probably Damaging	0.989	Neutral	-0.425	neutral	-28	probably benign	0.27
rs1216841973	G52S	Tolerated	0.19	3.33	Probably Damaging	0.999	Neutral	-1.373	effect	49	possibly damaging	0.5
rs752811424	Y60F	Deleterious	0.00	3.11	Probably Damaging	1.000	Neutral	-2.125	effect	43	possibly damaging	0.5
rs1221748361	A61T	Tolerated	0.91	3.11	Benign	0.004	Neutral	0.794	neutral	-70	probably benign	0.19
rs758465752	G64D	Tolerated	0.23	3.11	Possibly Damaging	0.782	Neutral	-1.171	effect	38	possibly damaging	0.5
rs1346241200	K65E	Tolerated	0.65	3.11	Benign	0.332	Neutral	-0.592	effect	43	possibly damaging	0.5
rs557116456	V69I	Tolerated	0.51	3.11	Benign	0.000	Neutral	0.196	neutral	-75	probably benign	0.27
	V69F	Tolerated	1.00	3.11	Benign	0.005	Neutral	1.348	effect	1	probably benign	0.27
rs757566658	V69A	Tolerated	0.15	3.11	Possibly Damaging	0.956	Neutral	-1.342	effect	42	probably benign	0.27
rs1347670398	V71L	Tolerated	0.15	3.11	Possibly Damaging	0.975	Neutral	-1.330	effect	57	possibly damaging	0.5
rs1206369281	T72A	Deleterious	0.05	3.11	Possibly Damaging	0.924	Deleterious	-3.464	effect	54	probably benign	0.27

rs781579729	T72I	Deleterious	0.01	3.11	Probably Damaging	0.998	Deleterious	-3.464	effect	60	probably benign	0.27
rs1196646336	R75L	Deleterious	0.02	3.11	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-4.122	effect	56	possibly damaging	0.5
rs1378866958	A77T	Tolerated	0.51	3.11	Benign	0.000	Neutral	0.336	neutral	-90	probably benign	0.19
rs754725143	S79N	Tolerated	0.07	3.11	Benign	0.000	Neutral	-0.263	neutral	-88	probably benign	0.19
	S79I	Deleterious	0.00	3.11	Benign	0.004	Deleterious	-3.674	neutral	-26	probably benign	0.19
rs1431375309	V81L	Tolerated	0.17	3.11	Benign	0.000	Neutral	-0.966	neutral	-26	probably benign	0.19
rs1422926559	V84I	Deleterious	0.00	3.11	Benign	0.041	Neutral	-0.512	neutral	-43	possibly damaging	0.5
rs376038796	A86V	Tolerated	1.00	3.11	Probably Damaging	1.000	Neutral	-0.895	effect	45	possibly damaging	0.5
rs1270679463	A87T	Tolerated	0.48	3.11	Benign	0.000	Neutral	0.036	neutral	-21	probably benign	0.27
rs1403336336	Y89H	Tolerated	0.28	3.11	Probably Damaging	1.000	Neutral	-2.429	effect	87	probably benign	0.27
rs370443546	M90V	Tolerated	0.14	3.11	Benign	0.044	Neutral	-0.160	neutral	-13	probably benign	0.19
rs746900785	M91L	Tolerated	0.64	3.11	Benign	0.003	Neutral	-0.497	effect	27	probably benign	0.19
rs1065442	M91T	Tolerated	0.39	3.11	Benign	0.004	Neutral	0.563	effect	29	probably benign	0.19
rs1052219132	M91I	Tolerated	0.39	3.11	Benign	0.003	Neutral	-0.193	effect	31	probably benign	0.19
rs770666846	E94V	Tolerated	0.23	3.11	Possibly Damaging	0.798	Neutral	-1.944	neutral	-22	probably benign	0.27
rs896360225	I102V	Tolerated	0.63	3.11	Benign	0.008	Neutral	-0.003	neutral	-34	probably benign	0.19
rs776440178	I102M	Tolerated	0.25	3.11	Possibly Damaging	0.837	Neutral	0.381	neutral	-2	probably benign	0.19
rs759232662	T104M	Tolerated	0.07	3.11	Benign	0.081	Neutral	-1.188	effect	12	probably benign	0.27
rs777843969	T106N	Tolerated	0.54	3.11	Benign	0.015	Neutral	-0.119	neutral	-33	probably benign	0.27

rs144988077	G109E	Tolerated	0.70	3.11	Benign	0.007	Neutral	0.069	neutral	23	possibly damaging	0.5
rs763030646	Q111L	Tolerated	0.14	3.11	Benign	0.006	Neutral	-2.095	effect	20	probably benign	0.19
rs1451326152	V112M	Deleterious	0.00	3.11	Probably Damaging	1.000	Neutral	-2.008	effect	71	possibly damaging	0.5
rs764089901	G118R	Deleterious	0.04	3.11	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-3.635	effect	85	Probably damaging	0.75
rs752037577	M122V	Tolerated	0.67	3.11	Benign	0.014	Neutral	-0.733	neutral	-35	probably benign	0.7
rs1422919298	M122T	Tolerated	1.00	3.11	Benign	0.011	Neutral	0.622	neutral	-5	probably benign	0.27
rs1325759242	M122I	Tolerated	0.42	3.11	Benign	0.000	Neutral	-0.885	effect	3	probably benign	0.27
rs1286462906	T124S	Deleterious	0.00	3.11	Benign	0.141	Deleterious	-2.937	effect	22	Probably damaging	0.57
rs757773669	T124M	Deleterious	0.00	3.11	Possibly Damaging	0.681	Deleterious	-4.417	effect	5	Probably damaging	0.57
rs750841862	I128M	Tolerated	0.19	3.11	Probably Damaging	0.995	Neutral	-0.731	neutral	-24	probably benign	0.27
rs1294482526	M134V	Deleterious	0.03	3.11	Probably Damaging	0.997	Deleterious	-3.044	effect	55	Possibly damaging	0.5
rs1357774202	L141Q	Tolerated	0.48	3.11	Possibly Damaging	0.535	Neutral	0.240	effect	12	probably benign	0.13
rs757989570	I143V	Tolerated	0.16	3.11	Benign	0.045	Neutral	0.287	neutral	-7	probably benign	0.19
rs1266819920	I143T	Tolerated	0.16	3.11	Benign	0.045	Neutral	-0.161	neutral	-14	probably benign	0.19
rs1356678649	N145H	Deleterious	0.00	3.11	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-4.185	effect	53	Possibly damaging	0.5
rs1204026047	N145S	Deleterious	0.00	3.11	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-4.010	neutral	-5	Possibly damaging	0.5
rs1466152724	T147A	Deleterious	0.00	3.11	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-4.638	effect	60	probably damaging	0.57
rs756706504	P156L	Tolerated	1.00	3.11	Probably Damaging	0.999	Neutral	-1.215	neutral	-12	Possibly damaging	0.5
rs745734610	P158L	Deleterious	0.02	3.11	Probably Damging	1.000	Deleterious	-4.111	effect	18	Possibly damaging	0.5

rs778733 155	S160 C	Deleterious	0.01	3.11	Probably Damaging	0.975	Neutral	-1.970	neutral	-29	Possibly damaging	0.5
rs139625 4904	W165 R	Deleterious	0.00	3.11	Probably Damaging	0.999	Deleterious	-6.824	effect	84	Possibly damaging	0.5
rs779775 271	I166 V	Tolerated	1.00	3.11	Benign	0.001	Neutral	0.063	neutral	-85	Possibly damaging	0.5
rs134819 5897	V170 F	Deleterious	0.01	3.11	Possibly damaging	0.843	Deleterious	-2.551	effect	57	Possibly damaging	0.5
rs768961 499	S171 T	Tolerated	0.53	3.11	Probably damaging	0.997	Neutral	-0.336	neutral	-47	Possibly damaging	0.5
rs963824 682	S172 L	Tolerated	0.22	3.11	Benign	0.171	Neutral	-1.684	neutral	-7	Possibly damaging	0.5
rs131029 7644	L180 F	Deleterious	0.00	3.11	Probably Damaging	0.989	Neutral	-1.964	effect	50	Possibly damaging	0.5
rs771987 351	A183 S	Deleterious	0.03	3.11	Possibly Damaging	0.819	Neutral	-1.699	neutral	-27	Possibly damaging	0.5
rs773775 010	S185 T	Tolerated	0.64	3.11	Possibly Damaging	0.704	Neutral	-0.420	neutral	-40	probably benign	0.27
rs761227 535	L186 S	Tolerated	0.08	3.11	Possibly Damaging	0.941	Neutral	-1.691	effect	16	Possibly damaging	0.5
rs120281 4386	S187 R	Tolerated	0.33	3.11	Benign	0.017	Neutral	-1.359	effect	2	probably benign	0.27
rs766875 859	K188 R	Tolerated	0.84	3.11	Benign	0.016	Neutral	-0.099	neutral	-32	Possibly damaging	0.5
rs199912 925	M189 V	Tolerated	0.46	3.11	Benign	0.000	Neutral	-1.207	neutral	-81	Possibly damaging	0.5
rs144028 6766	S194 N	Tolerated	0.76	3.11	Probably Damaging	0.991	Neutral	0.329	neutral	-15	Possibly damaging	0.5
rs144009 7102	P195 R	Tolerated	0.88	3.11	Benign	0.031	Neutral	2.451	neutral	-73	probably benign	0.27
rs767174 634	T198 K	Tolerated	0.86	3.11	Probably Damaging	1.000	Neutral	-0.267	effect	16	Possibly damaging	0.5
rs136110 2216	G199 R	Tolerated	0.09	3.11	Probably Damaging	1.000	Neutral	-2.142	effect	57	Possibly damaging	0.5
rs104653 3169	V200 F	Tolerated	0.09	3.11	Probably Damaging	1.000	Neutral	-1.076	effect	22	Possibly damaging	0.5
rs755615 887	V200 A	Tolerated	0.67	3.11	Probably Damaging	1.000	Neutral	-0.335	effect	22	Possibly damaging	0.5

rs120582 9960	P205 A	Tolerat ed	0.47	3.11	Probably Damaging	1.000	Neutral	-0.579	neutr al	-4	Possibly damaging	0.5
rs124502 3275	P206 A	Deleter ious	0.00	3.11	Probably Damaging	0.986	Deletar ious	-3.624	effect	46	Possibly damaging	0.5
rs127863 8729	T207 A	Tolerat ed	0.28	3.11	Possibly damaging	0.857	Neutral	-0.764	neutr al	-13	probably benign	0.27
rs754809 262	E208 D	Tolerat ed	0.29	3.11	Possibly damaging	0.856	Neutral	-0.927	effect	30	Possibly damaging	0.5
rs778534 474	P209 R	Deleter ious	0.02	3.11	Probably Damaging	1.000	Deleter ious	-3.594	effect	44	Possibly damaging	0.5
rs527697 475	C211 R	Tolerat ed	0.11	3.11	Possibly Damaging	0.893	Neutral	-1.503	effect	17	probably benign	0.27
rs758600 786	Q216 X	no result	no res ult	no res ult	no result	no result	Deleter ious	- 11.550	no result	no res ult	no result	no res ult
rs367760 388	I222 V	Deleter ious	0.00	4.32	Possibly Damaging	0.849	Neutral	0.273	neutr al	-51	Possibly damaging	0.5
Rs14443 67175	N223 S	Deleter ious	0.00	4.32	Probably Damaging	0.962	Neutral	-1.406	effect	2	probably benign	0.27

Annexe 02 : prédiction des nsSNPs de SRC par des outils bioinformatique

dbSNPrs# cluster id	Amino acid change	SIFT prediction	SIFT score	MSC	Polyphene prediction	Polyphene score	Provean prediction	Provean score	SNAP prediction	SNAP score	Panther prediction	Panther score
Rs767602518	S3T	Tolerated	0.19	4.32	benign	0.039	Neutral	-0.212	neutral	-53	Possibly Damaging	0.5
Rs1320051629	N4H	Tolerated	0.05	4.32	benign	0.000	Neutral	-0.292	neutral	-70	Probably Benign	0.27
Rs1262407930	K5N	Deleterious	0.00	4.32	Probably damaging	0.993	Neutral	-0.590	neutral	-48	Probably DAMAGING	0.57
Rs1251001677	D10N	Tolerated	0.36	4.32	benign	0.181	Neutral	-0.605	neutral	-69	Possibly Damaging	0.5
Rs1318197870	A11T	Tolerated	0.59	4.32	benign	0.039	Neutral	-0.091	neutral	-68	Probably Benign	0.27
Rs1212841399	A11V	Tolerated	0.24	4.32	benign	0.000	Neutral	-1.064	neutral	-76	Probably Benign	0.27
Rs1250842919	Q13R	Tolerated	0.65	4.32	benign	0.090	Neutral	-0.291	neutral	-34	Probably DAMAGING	0.57
Rs1162867836	E19Q	Deleterious	0.03	4.32	benign	0.321	Neutral	0.176-	neutral	-56	Possibly Damaging	0.5
Rs753143221	P20A	Tolerated	1.00	4.32	benign	0.004	Neutral	0.032	neutral	-45	Possibly Damaging	0.5
Rs1416764320	E22K	Tolerated	0.47	4.32	benign	0.186	Neutral	0.095	effect	9	Probably DAMAGING	0.57
Rs764712270	N23T	Tolerated	0.58	4.32	benign	0.020	Neutral	-0.510	neutral	-53	Probably Benign	0.27
Rs1188439975	H25D	Tolerated	0.72	4.32	benign	0.000	Neutral	-0.238	effect	29	Probably Damaging	0.57
Rs779676153	G26R	Tolerated	0.37	4.32	possibly damaging	0.808	Neutral	-0.889	neutral	-2	Probably Benign	0.27
Rs750998052	G28S	Tolerated	0.58	3.69	benign	0.008	Neutral	0.034	neutral	-29	Probably Benign	0.27
Rs1437496392	A31T	Tolerated	0.75	3.57	benign	0.091	Neutral	-0.441	neutral	-52	Probably Benign	0.27
Rs754705008	F32S	Tolerated	0.51	3.55	benign	0.002	Neutral	0.536	effect	23	Possibly Damaging	0.5
Rs1371352984	P33A	Tolerated	0.16	3.55	benign	0.044	Neutral	0.060	neutral	-29	Probably Benign	0.27
Rs1288993928	A34P	Tolerated	0.22	3.56	benign	0.240	Neutral	-0.192	neutral	-21	Probably Damaging	0.57
	A34T	Tolerated	0.45	3.56	benign	0.001	Neutral	0.234	neutral	-62	Probably Damaging	0.57
Rs1447509893	A34D	Tolerated	0.25	3.56	benign	0.058	Neutral	0.213	neutral	-35	Probably Damaging	0.57

Rs1232549534	S35A	Tolerated	0.22	3.55	benign	0.083	Neutral	-0.844	neutral	-42	Probably Damaging	0.57
Rs55962640	Q36H	Tolerated	0.29	3.53	possibly damaging	0.845	Neutral	-0.817	neutral	-64	Probably Damaging	0.57
Rs911387445	T37P	Deleterious	0.02	3.53	Probably damaging	0.999	Neutral	-1.536	neutral	-16	Probably Damaging	0.57
Rs769523302	T37I	Deleterious	0.01	3.53	Probably damaging	0.999	Neutral	-2.073	neutral	-3	Probably Damaging	0.57
Rs777533514	P38L	Deleterious	0.02	3.53	Probably damaging	1.000	Neutral	-1.761	neutral	-9	Probably Damaging	0.57
	P38R	Deleterious	0.02	3.53	Probably damaging	1.000	Neutral	-1.396	neutral	-37	Probably Damaging	0.57
Rs1479413147	S39N	Tolerated	0.53	3.52	benign	0.000	Neutral	-0.400	neutral	-76	Probably Benign	0.27
Rs1269537486	P41A	Tolerated	0.29	3.71	benign	0.004	Neutral	-1.186	neutral	-7	Probably Benign	0.27
Rs1475181251	S43W	Tolerated	0.09	3.72	possibly damaging	0.932	Neutral	-1.468	Effect	19	Probably Benign	0.27
Rs1186378528	A44S	Tolerated	0.70	3.72	benign	0.039	Neutral	0.463	neutral	-61	Probably Benign	0.27
Rs1420527845	A44G	Tolerated	0.53	3.72	benign	0.039	Neutral	-0.247	neutral	-24	Probably Benign	0.27
Rs1406297899	D45Y	Tolerated	1.00	3.71	Probably damaging	0.969	Neutral	-0.735	effect	18	Probably Damaging	0.57
	D45N	Tolerated	0.38	3.71	possibly damaging	0.760	Neutral	-0.512	neutral	-29	Probably Damaging	0.57
Rs770744364	G46C	Tolerated	0.14	5.53	possibly damaging	0.938	Neutral	-0.959	neutral	-22	Probably Benign	0.27
	G46S	Tolerated	1.00	3.53	benign	0.004	Neutral	-0.095	neutral	-60	Probably Benign	0.27
Rs1352982585	H47Y	Tolerated	0.95	3.53	possibly damaging	0.608	Neutral	-0.365	neutral	-38	Probably Damaging	0.57
Rs1354854561	R48G	Tolerated	0.29	3.53	possibly damaging	0.564	Neutral	-0.437	effect	39	Probably Damaging	0.57
Rs1414132534	S51G	Tolerated	0.33	3.53	benign	0.000	Neutral	-1.070	neutral	-12	Probably Benign	0.27
Rs1291332754	S51N	Tolerated	0.32	3.53	benign	0.020	Neutral	0.174	neutral	-45	Probably Benign	0.27
Rs1228673150	A52T	Tolerated	0.57	3.53	benign	0.000	Neutral	0.401	neutral	-77	Probably Benign	0.19
Rs1235559294	A53T	Tolerated	0.91	3.74	benign	0.020	Neutral	0.169	neutral	-71	Probably Benign	0.27
Rs1206123440	A55D	Tolerated	0.61	3.73	benign	0.006	Neutral	-0.233	neutral	-14	Probably Benign	0.27
Rs1270136897	P56S	Tolerated	0.76	3.73	benign	0.000	Neutral	-0.447	neutral	-20	Probably Benign	0.27

Rs1432190943	A57T	Tolerated	0.73	4.04	benign	0.001	Neutral	-0.075	neutral	-82	Probably Benign	0.27
Rs1260223338	A59T	Tolerated	0.62	4.04	benign	0.001	Neutral	0.296	neutral	-71	Probably Benign	0.27
Rs8661331337	A59V	Tolerated	1.00	4.04	benign	0.020	Neutral	-0.763	neutral	-60	Probably Benign	0.27
Rs1034743332	E60D	Tolerated	0.69	4.04	benign	0.000	Neutral	-0.059	neutral	-29	Possibly Damaging	0.27
Rs1186308773	P61H	Deleterious	0.02	4.04	benign	0.291	Neutral	-1.722	neutral	-10	Probably Damaging	0.57
Rs1417751781	K62M	Tolerated	0.06	4.32	benign	0.168	Neutral	-0.440	neutral	-51	Possibly Damaging	0.5
Rs1169430712	F64L	Tolerated	0.22	3.67	benign	0.002	Neutral	-0.939	neutral	-6	Probably Damaging	0.74
Rs956880395	N68D	Tolerated	0.37	3.54	benign	0.000	Neutral	-1.151	neutral	-51	Probably Damaging	0.57
Rs1432925945	S69P	Tolerated	0.26	3.54	benign	0.167	Neutral	0.147	neutral	-53	Probably Benign	0.27
Rs1009723505	T74N	Tolerated	0.43	3.53	possibly damaging	0.791	Neutral	-0.641	neutral	-63	Probably Damaging	0.57
Rs1406890537	S75P	Tolerated	0.43	3.43	possibly damaging	0.671	Neutral	0.619	neutral	-63	Probably Damaging	0.74
Rs775787758	P76S	Tolerated	0.88	3.43	benign	0.015	Neutral	-0.706	neutral	-46	Probably Damaging	0.57
Rs1417211462	P76L	Tolerated	0.30	3.43	possibly damaging	0.871	Neutral	-1.344	neutral	-31	Probably Damaging	0.57
Rs1346600412	A79T	Tolerated	0.57	3.28	benign	0.000	Neutral	-0.337	neutral	-89	Probably Benign	0.27
Rs764609637	A79V	Tolerated	0.29	3.28	benign	0.007	Neutral	0.764-	neutral	-82	Probably Benign	0.27
Rs1249784345	G80D	Deleterious	0.03	3.20	possibly damaging	0.808	Neutral	-1.811	neutral	-42	Probably Damaging	0.57
Rs1280055104	P81Q	Tolerated	0.10	3.23	possibly damaging	0.640	Neutral	-0.929	neutral	-63	Possibly Damaging	0.5
Rs1487039786	G84S	Tolerated	0.35	3.16	Probably damaging	1.000	Neutral	-0.507	neutral	-86	Probably Damaging	0.74
Rs755760984	V86L	Tolerated	0.28	3.21	Probably damaging	0.994	Neutral	-1.269	neutral	-55	Probably Damaging	0.74
Rs777586605	V86E	Tolerated	0.15	3.21	Probably damaging	0.999	Neutral	-1.923	neutral	-53	Probably Damaging	0.74
Rs1451326787	T99K	Tolerated	0.26	3.05	Probably damaging	0.983	Deleterious	-3.495	effect	2	Probably Damaging	0.78

Rs1340628132	F105L	Tolerated	0.18	3.05	Probably damaging	1.000	Deleterious	-4.896	effect	31	Probably Damaging	0.85
Rs772219397	R110W	Deleterious	0.00	3.05	Probably damaging	1.000	Deleterious	-4.062	effect	48	Probably Damaging	0.57
Rs747298865	R110Q	Tolerated	0.43	3.05	Probably damaging	1.000	Neutral	-0.915	neutral	-56	Probably Damaging	0.57
Rs377182327	L111F	Tolerated	0.60	3.05	Probably damaging	1.000	Neutral	-0.501	neutral	-72	Probably Damaging	0.57
Rs768964838	Q112H	Tolerated	0.22	3.05	Probably damaging	0.999	Neutral	-0.575	neutral	-85	Probably Damaging	0.74
Rs1159660243	N116S	Tolerated	0.29	3.05	possibly damaging	0.902	Neutral	-1.685	neutral	-79	Probably Damaging	0.78
Rs762030353	T117I	Deleterious	0.05	3.05	Probably damaging	1.000	Deleterious	-2.528	effect	18	Probably Damaging	0.78
Rs1446194954	A124V	Tolerated	0.11	3.05	Benign	0.045	Deleterious	-3.077	neutral	-22	Probably Damaging	0.85
Rs760138531	S126L	Tolerated	0.06	3.05	Probably damaging	0.994	deleterious	-4.025	neutral	-12	Probably Damaging	0.85
Rs753372606	S128C	Deleterious	0.02	3.05	possibly damaging	0.656	Neutral	-1.602	neutral	-11	Probably Benign	0.27
Rs750199560	Q131E	Tolerated	0.61	3.06	Benign	0.004	Neutral	-0.569	neutral	-16	Probably Damaging	0.57
Rs374918628	T132A	Tolerated	0.51	3.15	Benign	0.070	Neutral	-1.162	neutral	-2	Probably Damaging	0.57
Rs1241057049	T132R	Tolerated	0.38	3.15	possibly damaging	0.530	Neutral	-0.861	neutral	-20	Probably Damaging	0.57
Rs1412626612	P136R	Deleterious	0.00	3.06	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-7.693	effect	75	Probably Damaging	0.85
Rs755055234	A141V	Deleterious	0.02	3.05	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-3.195	effect	28	Probably Damaging	0.85
Rs748389510	D144N	Tolerated	0.76	3.05	Probably Damaging	0.996	Neutral	-1.246	neutral	-86	Probably Damaging	0.74
Rs770029502	Q147X	no result	no result	no result	no result	no result	Deleterious	-1384.621	no result	no result	no result	no result
Rs746439256	W151C	Deleterious	0.00	3.05	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-11.155	effect	75	Probably Damaging	0.85
Rs772598405	G154S	Deleterious	0.02	3.05	Possibly Damaging	0.857	Deleterious	-3.739	effect	60	Probably Damaging	0.85

Rs776051245	I156 V	Tolerated	0.45	3.05	Possibly Damaging	0.931	Neutral	-0.577	neutral	-19	Probably Damaging	0.78
Rs769358602	R159 W	Deleterious	0.00	3.05	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-4.146	effect	41	Probably Damaging	0.57
Rs1368749598	E162 Q	Deleterious	0.01	3.05	Possibly Damaging	0.922	Deleterious	-2.610	effect	47	Probably Damaging	0.85
Rs762684562	L164 V	Tolerated	0.16	3.05	Possibly Damaging	0.666	Neutral	-0.537	neutral	-32	Probably Damaging	0.57
Rs969649905	L165 M	Deleterious	0.00	3.05	Probably Damaging	1.000	Neutral	-1.677	neutral	-4	Probably Damaging	0.85
Rs971949259	N167 H	Tolerated	0.39	3.12	Possibly Damaging	0.857	Neutral	-0.994	neutral	-87	Possibly Damaging	0.5
Rs572415651	A168 P	Tolerated	1.00	3.05	Benign	0.000	Neutral	1.265	neutral	-93	Probably Benign	0.27
Rs1250584696	A168 G	Tolerated	0.65	3.05	Benign	0.133	Neutral	-1.128	neutral	-84	Probably Benign	0.27
Rs751370904	E169 G	Tolerated	0.83	3.05	Probably Damaging	0.992	Neutral	4.197	neutral	-72	Probably Damaging	0.57
Rs759443292	N170 K	Deleterious	0.01	3.05	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-3.831	effect	47	Probably Damaging	0.85
Rs540682385	P171 L	Tolerated	0.28	3.17	Probably Damaging	0.970	Deleterious	-3.615	neutral	-34	Probably Damaging	0.74
Rs1366542593	G173 V	Deleterious	0.00	3.05	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-7.808	effect	68	Probably Damaging	0.85
Rs1207997534	T174 S	Tolerated	1.00	3.04	Probably Damaging	0.999	Neutral	-1.699	neutral	-65	Probably Damaging	0.85
Rs6018260	L176 F	Deleterious	0.00	3.04	Possibly Damaging	0.920	Deleterious	-3.172	effect	54	Probably Damaging	0.78
Rs143889833	V177 M	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	0.983	Neutral	-2.045	effect	34	Probably Damaging	0.57
	V177 L	Deleterious	0.02	3.04	Benign	0.080	Neutral	-1.433	neutral	-4	Probably Damaging	0.57
Rs1416349077	R178 X	no result	no result	no result	no result	no result	deleterious	-1299.731	no result	no result	no result	no result
Rs758848299	E179 D	Tolerated	0.18	3.04	Benign	0.212	Neutral	-1.172	neutral	-34	Probably Damaging	0.78
Rs1388458954	T182I	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	0.999	Deleterious	-4.189	effect	49	Probably Damaging	0.78
Rs146865960	T183 M	Deleterious	0.01	3.04	Probably Damaging	0.990	Deleterious	-3.095	neutral	-71	Probably Damaging	0.74

Rs75363208	Y187 S	Deleterious	0.01	3.01	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-7.474	effect	76	Probably Damaging	0.74
Rs1158176653	F194 V	Tolerated	0.15	3.23	Benign	0.393	Neutral	-2.443	neutral	-52	Possibly Damaging	0.5
Rs1198824064	D195 N	Deleterious	0.00	3.23	Probably Damaging	0.999	Deleterious	-3.608	effect	44	Probably Damaging	0.85
Rs1198673480	D195 E	Tolerated	0.12	3.23	Possibly Damaging	0.944	Deleterious	-2.668	neutral	-31	Probably Damaging	0.85
Rs1458527600	N196 Y	Deleterious	0.03	3.14	Possibly Damaging	0.955	Neutral	-1.960	effect	18	Probably Damaging	0.57
	N196 D	Tolerated	0.69	3.14	Possibly Damaging	0.695	Neutral	0.869	neutral	-66	Probably Damaging	0.57
Rs755567292	A197 T	Tolerated	0.74	3.24	Benign	0.000	Neutral	-0.042	neutral	-87	Possibly Damaging	0.5
	A197 S	Tolerated	0.85	3.24	Benign	0.000	Neutral	-0.086	neutral	-76	Possibly Damaging	0.5
Rs781751002	A197 V	Tolerated	0.67	3.24	Benign	0.000	Neutral	-0.672	neutral	-87	Possibly Damaging	0.5
Rs1276049609	K198 R	Tolerated	1.00	3.10	Benign	0.001	Neutral	-0.788	neutral	-53	Possibly Damaging	0.5
Rs7534044366	G199 V	Deleterious	0.00	3.09	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-7.043	effect	52	Probably Damaging	0.85
	G199 D	Tolerated	0.06	3.09	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-5.529	effect	68	Probably Damaging	0.85
Rs1048616788	L200 R	Tolerated	0.31	3.19	Possibly Damaging	0.901	Neutral	1.025	effect	28	Probably Damaging	0.57
Rs368312821	V202 L	Deleterious	0.01	3.04	Benign	0.180	Deleterious	-2.574	effect	76	Probably Damaging	0.85
	V202 M	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	0.995	Deleterious	-2.659	effect	67	Probably Damaging	0.85
Rs1331636640	V202 A	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	0.995	Deleterious	-3.613	effect	61	Probably Damaging	0.85
Rs778554009	R208 C	Deleterious	0.00	3.04	Benign	0.423	Deleterious	-7.162	effect	19	Probably Damaging	0.85
Rs867236697	R208 H	Deleterious	0.01	3.04	Possibly Damaging	0.917	Deleterious	-4.469	effect	43	Probably Damaging	0.85
Rs1289430309	L210 V	Deleterious	0.04	3.04	Probably Damaging	0.989	Neutral	-2.256	effect	32	Probably Damaging	0.78

Rs1450021163	S212T	Tolerated	0.37	3.04	Benign	0.012	Neutral	-0.868	neutral	-83	Probably Damaging	0.57
Rs1478333895	G214C	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-8.160	effect	37	Probably Damaging	0.85
Rs1409547366	T218S	Tolerated	0.44	3.04	Probably Damaging	0.996	Neutral	-1.352	neutral	-65	Probably Damaging	0.85
Rs768609250	R220C	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-6.585	Effect	50	Probably Damaging	0.85
Rs1192783756	T221A	Tolerated	1.00	3.04	Probably Damaging	0.989	Neutral	0.809	neutral	-65	Probably Damaging	0.57
Rs761890358	F223L	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	0.997	Deleterious	-4.873	effect	64	Probably Damaging	0.85
Rs1409798282	S225G	Tolerated	0.12	3.04	Possibly Damaging	0.573	Deleterious	-2.527	effect	7	Probably Damaging	0.57
Rs769916129	S225I	Deleterious	0.05	3.04	Possibly Damaging	0.763	Deleterious	-2.978	effect	43	Probably Damaging	0.57
Rs1229404250	Q227K	Tolerated	0.14	3.04	Possibly Damaging	0.931	Neutral	-1.727	neutral	-51	Probably Damaging	0.74
Rs1466226424	V230A	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-3.556	effect	40	Probably Damaging	0.85
Rs149158994	Y232C	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	0.996	Deleterious	-5.053	effect	55	Probably Damaging	0.5
Rs751989465	S234A	Tolerated	0.12	3.04	Benign	0.002	Neutral	-1.099	neutral	-2	Probably Damaging	0.57
Rs759914792	S234Y	Deleterious	0.02	3.04	Benign	0.249	Neutral	-2.390	neutral	-7	Probably Damaging	0.57
	S234C	Deleterious	0.01	3.04	Possibly Damaging	0.805	Neutral	-2.190	neutral	-17	Probably Damaging	0.57
Rs1400593225	K235R	Tolerated	0.20	3.04	Benign	0.000	Neutral	-0.604	neutral	-75	Probably Damaging	0.57
Rs1401292418	H236R	Tolerated	0.53	3.04	Probably Damaging	0.965	Neutral	-0.076	neutral	-28	Probably Damaging	0.57
Rs34881773	A237T	Tolerated	0.11	3.04	Possibly Damaging	0.587	Neutral	-10585	neutral	-39	Probably Damaging	0.85
Rs1433113895	D238N	Deleterious	0.04	3.04	Probably Damaging	0.995	Deleterious	-3.724	effect	58	Probably Damaging	0.85
Rs1365991950	H242R	Tolerated	0.35	3.11	Probably Damaging	0.965	Neutral	-1.150	neutral	-19	Probably Damaging	0.57

Rs751268997	R243 H	Tolerated	0.08	3.11	Possibly Damaging	0.922	Deleterious	-2.572	effect	24	Probably Damaging	0.57
Rs754617799	T245 S	Tolerated	0.86	3.04	Benign	0.99	Neutral	-2.084	neutral	-71	Probably Damaging	0.78
	T245 N	Tolerated	0.50	3.04	Benign	0.290	Deleterious	-3.004	neutral	-19	Probably Damaging	0.78
Rs370773419	T246 S	Tolerated	0.65	3.04	Benign	0.000	Neutral	-0.427	neutral	-84	Probably Benign	0.27
Rs1464185975	V247 M	Tolerated	0.06	3.04	Possibly Damaging	0.935	Neutral	-0.477	effect	7	Probably Damaging	0.57
Rs1191846929	V247 A	Tolerated	0.38	3.04	Possibly Damaging	0.932	Neutral	0.956	neutral	-18	Probably Damaging	0.57
Rs756112018	P249 A	Tolerated	0.52	3.04	Benign	0.074	Deleterious	-3.193	neutral	-49	Probably Damaging	0.57
Rs901620408	T250 A	Tolerated	0.46	3.04	Benign	0.001	Neutral	-0.901	neutral	-50	Probably Damaging	0.57
Rs767829559	T250 K	Tolerated	1.00	3.04	Benign	0.010	Neutral	0.841	neutral	-73	Probably Damaging	0.57
	T250 M	Tolerated	0.06	3.04	Benign	0.132	Neutral	-0.989	neutral	-41	Probably Damaging	0.57
Rs774569491	K252 N	Tolerated	0.06	3.04	Possibly Damaging	0.889	Neutral	-1.674	neutral	-41	Probably Damaging	0.74
Rs551439047	P253 L	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-8.392	effect	11	Probably Damaging	0.85
Rs973446215	T255 A	Tolerated	0.33	3.07	Probably Damaging	0.992	Deleterious	-2.783	neutral	-43	Probably Damaging	0.85
Rs147010442	Q256 H	Tolerated	0.56	3.04	Probably Damaging	0.982	Neutral	-1.066	neutral	-42	Probably Damaging	0.57
Rs1455889060	L258 Q	Deleterious	0.01	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-3.474	effect	18	Probably Damaging	0.74
Rs1274262123	A262 T	Tolerated	0.53	3.04	Probably Damaging	0.996	Neutral	-1.511	neutral	-56	Probably Damaging	0.74
Rs1235463689	E264 A	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	0.999	Deleterious	-5.427	effect	38	Probably Damaging	0.85
Rs764665699	P266 L	Deleterious	0.02	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-6.618	neutral	0	Probably Damaging	0.85
Rs776941746	R267 Q	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-3.595	effect	48	Probably Damaging	0.85
Rs1475233098	E268 D	Tolerated	0.29	3.04	Benign	0.001	Neutral	-1.004	neutral	-74	Probably Damaging	0.5

Rs1328205125	S269L	Deleterious	0.01	3.04	Probably Damaging	0.999	Deleterious	-4.874	effect	9	Probably Damaging	0.85
Rs148049198	R271W	Deleterious	0.02	3.04	Probably Damaging	0.993	Deleterious	-3.472	effect	29	Probably Damaging	0.57
Rs533607141	R271Q	Tolerated	0.74	3.04	Probably Damaging	0.993	Neutral	-0.324	neutral	-64	Probably Damaging	0.57
Rs754650463	L272P	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-6.183	effect	40	Probably Damaging	0.78
Rs752496798	E273G	Tolerated	0.37	3.04	Possibly Damaging	0.950	Deleterious	-3.070	neutral	-73	Probably Damaging	0.57
Rs766744528	E283k	Deleterious	0.00	3.04	Benign	0.065	Deleterious	-3.390	effect	67	Probably Damaging	0.85
Rs1246093856	N290S	Deleterious	0.01	3.04	Probably Damaging	0.999	Deleterious	-4.210	neutral	-24	Probably Damaging	0.85
Rs1340705473	G291S	Tolerated	0.09	3.04	Possibly Damaging	0.652	Deleterious	-2.860	neutral	-49	Probably Damaging	0.85
Rs1207881818	G291D	Tolerated	0.20	3.04	Benign	0.010	Deleterious	-3.565	neutral	-31	Probably Damaging	0.85
Rs1233868589	T292S	Tolerated	0.78	3.04	Possibly Damaging	0.811	Neutral	-1.243	neutral	-86	Probably Damaging	0.85
Rs111844926	T292I	Deleterious	0.03	3.04	Probably Damaging	0.989	Deleterious	-3.928	neutral	-14	Probably Damaging	0.85
	T292N	Tolerated	0.53	3.04	Possibly Damaging	0.930	Neutral	-0.967	neutral	-89	Probably Damaging	0.85
Rs1397126729	T293I	Tolerated	0.15	3.04	Probably Damaging	0.981	Deleterious	-5.039	neutral	-40	Probably Damaging	0.85
Rs750534584	A296S	Deleterious	0.00	3.04	Possibly Damaging	0.528	deleterious	-2.886	effect	62	Probably Damaging	0.85
Rs1168068913	I297V	Tolerated	1.00	3.04	Probably Damaging	0.969	Neutral	0.398	neutral	-88	Probably Damaging	0.57
Rs1388365171	T299I	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-5.581	neutral	-26	Probably Damaging	0.85
Rs956512588	L300P	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	1.000	deleterious	-6.426	effect	72	Probably Damaging	0.85
Rs1172425959	T304M	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-4.781	effect	6	Probably Damaging	0.85
Rs747257425	Q315H	Tolerated	0.10	3.04	Probably Damaging	0.967	Neutral	-2.048	neutral	-8	Probably Damaging	0.74

Rs768889863	K319R	Tolerated	0.21	3.04	Possibly Damaging	0.893	Neutral	-1.296	neutral	-69	Probably Damaging	0.74
Rs996960011	Q327H	Deleterious	0.03	3.04	Probably Damaging	0.997	Deleterious	-3.459	effect	1	Probably Damaging	0.74
Rs1411658070	Y329C	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-7.690	effect	49	Probably Damaging	0.85
Rs1274322227	A330D	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	0.982	Deleterious	-5.807	effect	67	Probably Damaging	0.85
Rs867593338	V340I	Tolerated	0.63	3.04	Benign	0.030	Neutral	-0.489	neutral	-86	Probably Damaging	0.78
Rs754968435	M344L	Deleterious	0.02	3.04	Benign	0.007	Deleterious	-2.902	Effect	85	Probably Damaging	0.85
Rs763438144	S345N	Tolerated	0.36	3.04	Benign	0.012	Neutral	-1.281	neutral	-85	Probably Damaging	0.74
Rs1224513777	T357R	Tolerated	0.23	3.05	Benign	0.315	Neutral	0.189	neutral	-77	Probably Benign	0.27
	T357I	Tolerated	0.08	3.05	Benign	0.034	Neutral	-1.789	neutral	-30	Probably Benign	0.27
Rs1289307625	K359R	Tolerated	0.72	3.05	Benign	0.001	Neutral	0.611	neutral	-84	Possibly Damaging	0.5
Rs984277412	R362W	Deleterious	0.01	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-4.653	effect	59	Probably Damaging	0.57
Rs1160967723	P364S	Tolerated	0.23	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-5.670	neutral	-44	Probably Damaging	0.74
Rs778642449	V367M	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	1.000	Neutral	-2.304	effect	12	Probably Damaging	0.57
Rs1056974481	M369L	Deleterious	0.04	3.04	Benign	0.067	Neutral	-2.273	effect	41	Probably Damaging	0.85
Rs763031752	M369I	Tolerated	0.08	3.04	Benign	0.067	Deleterious	-2.801	neutral	-18	Probably Damaging	0.85
Rs1249301882	A370V	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	0.969	Deleterious	-3.381	effect	48	Probably Damaging	0.85
Rs751597996	Q372X	no result	no result	no result	no result	no result	deleterious	-681.939	no result	no result	no result	no result
Rs994208712	A374T	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-3.858	effect	72	Probably Damaging	0.85
Rs1181484011	S375L	Deleterious	0.02	3.04	Possibly Damaging	0.800	Deleterious	-3.741	effect	31	Probably Damaging	0.57
Rs1190315469	V380M	Tolerated	0.18	3.04	Probably Damaging	1.000	Neutral	-0.339	neutral	-93	Probably Damaging	0.57

Rs764262104	R382 W	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-5.259	effect	58	Probably Damaging	0.74
Rs754204413	R382 L	Tolerated	0.08	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-4.054	neutral	-61	Probably Damaging	0.74
	R382 Q	Tolerated	0.30	3.04	Probably Damaging	1.000	Neutral	-1.807	neutral	-90	Probably Damaging	0.74
Rs751005087	V386 I	Tolerated	1.00	3.04	Probably Damaging	0.993	Neutral	0.560	neutral	-91	Probably Damaging	0.57
Rs125213808 1	R388 W	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-7.896	effect	93	Probably Damaging	0.85
Rs867805553	R391 C	Tolerated	0.05	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-4.604	effect	29	Probably Damaging	0.78
Rs758795351	R391 H	Deleterious	0.03	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-3.467	effect	75	Probably Damaging	0.78
Rs77538537	N400 T	Tolerated	0.24	3.04	Benign	0.214	Neutral	-2.121	neutral	-77	Probably Damaging	0.85
Rs133935417 6	C403 Y	Tolerated	0.09	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-8.369	neutral	-2	Probably Damaging	0.78
Rs186207963	D407 N	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	0.992	Deleterious	-4.938	effect	91	Probably Damaging	0.85
Rs127407898 3	E418 K	Deleterious	0.04	3.04	Probably Damaging	0.996	Deleterious	-3.790	effect	33	Probably Damaging	0.85
Rs142822674	T420 M	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-3.206	neutral	--5	Probably Damaging	0.74
Rs145944471 4	R422 W	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-6.268	effect	81	Probably Damaging	0.85
Rs759567556	R422 Q	Tolerated	0.14	3.04	Probably Damaging	1.000	Neutral	-2.318	effect	24	Probably Damaging	0.85
Rs120865510 5	G424 D	Deleterious	0.01	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-6.914	effect	69	Probably Damaging	0.85
Rs129444748 5	K426 R	Tolerated	0.12	3.04	Benign	0.001	Deleterious	-2.806	effect	2	Probably Damaging	0.85
Rs149096928 7	T432 M	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-5.924	neutral	-7	Probably Damaging	0.85
Rs120063764 1	P434 A	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-7.891	effect	62	Probably Damaging	0.85
Rs125150658 4	E435 K	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	0.999	Deleterious	-3.944	effect	90	Probably Damaging	0.85

Rs1417607384	A436T	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	0.998	Deleterious	-3.939	neutral	-3	Probably Damaging	0.85
Rs7456121556	Y439C	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-6.905	effect	25	Probably Damaging	0.74
Rs202242810	R441C	Tolerated	0.08	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-5.914	effect	25	Probably Damaging	0.57
Rs772053084	R441H	Deleterious	0.03	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-3.793	effect	27	Probably Damaging	0.57
Rs1406655378	S446L	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-5.914	effect	80	Probably Damaging	0.85
Rs1056084684	V448L	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	0.990	Deleterious	-2.890	effect	75	Probably Damaging	0.85
Rs765324314	I453V	Tolerated	0.33	3.04	Probably Damaging	1.000	Neutral	-0.705	neutral	-87	Probably Damaging	0.85
Rs1171125750	T460K	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-5.608	effect	62	Probably Damaging	0.85
Rs752182272	R463Q	Tolerated	0.10	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-3.584	neutral	-46	Probably Damaging	0.85
Rs1251532695	P465S	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-7.891	effect	65	Probably Damaging	0.85
Rs997451700	G468V	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-8.770	effect	38	Probably Damaging	0.85
Rs1221989600	R472C	Tolerated	0.09	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-4.707	neutral	-23	Probably Damaging	0.85
Rs774838914	R472H	Deleterious	0.02	3.04	Probably Damaging	0.993	Deleterious	-3.101	neutral	-82	Probably Damaging	0.85
Rs1484879243	D476N	Tolerated	0.05	3.04	Probably Damaging	0.987	Neutral	-1.474	neutral	-79	Probably Damaging	0.57
Rs950614364	D476E	Tolerated	1.00	3.04	Possibly Damaging	0.887	Neutral	1.446	neutral	-95	Probably Damaging	0.57
Rs1420046989	V478M	Deleterious	0.02	3.04	Probably Damaging	0.998	Neutral	-20127	effect	5	Probably Damaging	0.85
Rs1479989919	R480W	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	0.999	Deleterious	-5.586	effect	18	Probably Damaging	0.78
Rs1173914321	R480Q	Tolerated	0.37	3.04	Probably Damaging	0.975	Neutral	-1.567	neutral	-90	Probably Damaging	0.78
Rs768098520	R483W	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-7.359	effect	81	Probably Damaging	0.85

Rs753395244	R483 Q	Deleterious	0.01	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-3.591	effect	58	Probably Damaging	0.85
Rs1317072077	P485 L	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-8.572	effect	17	Probably Damaging	0.85
Rs1342906456	C486 Y	Tolerated	0.07	3.04	Probably Damaging	0.999	Deleterious	-4.899	neutral	-15	Probably Damaging	0.74
Rs756665933	P487 L	Deleterious	0.02	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-7.156	effect	12	Probably Damaging	0.85
Rs750108303	P488 L	Tolerated	0.26	3.04	Possibly Damaging	0.642	Deleterious	-4.672	neutral	-63	Probably Damaging	0.57
Rs758015155	E489 Q	Deleterious	0.04	3.04	Benign	0.381	Neutral	-0.568	neutral	-66	Probably Damaging	0.5
Rs780921646	S493 Y	Deleterious	0.01	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-4.373	neutral	-16	Probably Damaging	0.85
	S493 F	Deleterious	0.01	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-4.639	neutral	-7	Probably Damaging	0.85
Rs1197051295	D496 N	Tolerated	0.27	3.04	Possibly Damaging	0.697	Neutral	-1.576	neutral	-49	Probably Damaging	0.5
Rs769834016	L497 F	Deleterious	0.01	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-2.639	effect	29	Probably Damaging	0.74
	L497 V	Tolerated	0.17	3.04	Probably Damaging	0.998	Neutral	-0.658	neutral	-63	Probably Damaging	0.74
Rs1344423676	M498 L	Tolerated	0.08	3.04	Possibly Damaging	0.629	Deleterious	-2.759	effect	53	Probably Damaging	0.85
Rs1303357004	C499 R	Tolerated	0.59	3.04	Benign	0.328	Neutral	-0.346	neutral	-67	Probably Damaging	0.57
Rs564099857	R503 W	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	0.999	Deleterious	-4.952	effect	41	Probably Damaging	0.57
Rs1405253806	R503 Q	Tolerated	0.21	3.04	Probably Damaging	0.993	Neutral	-1.336	neutral	-85	Probably Damaging	0.57
Rs771233913	E505 D	Tolerated	1.00	3.04	Benign	0.000	Neutral	1.110	neutral	-96	Probably Benign	0.27
Rs1159129326	P506 S	Deleterious	0.01	3.04	Possibly Damaging	0.890	Deleterious	-6.377	effect	39	Probably Damaging	0.85
Rs13053388441	R509 W	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-7.871	effect	91	Probably Damaging	0.85
Rs1346524802	P510 A	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-7.083	effect	45	Probably Damaging	0.85
	P510 S	Deleterious	0.00	3.04	Probably Damaging	1.000	Deleterious	-6.985	effect	35	Probably Damaging	0.85

Rs768153592	A517 G	Tolerat ed	0.42	3.04	Benign	0.99	Neutral	0.169	neutral	-90	Probably Damagin g	0.57
Rs135869418 1	T524 M	Deleter ious	0.00	3.18	Probably Damagin g	0.995	Deleter ious	-2.966	neutral	-63	Probably Damagin g	0.74
Rs749923525	T526 A	Tolerat ed	0.12	3.17	Possibly Damagin g	0.911	Deleter ious	-3.256	neutral	-31	Probably Damagin g	0.85
Rs118074668 8	T526I	Deleter ious	0.00	3.17	Probably Damagin g	0.989	Deleter ious	-4.808	neutral	-9	Probably Damagin g	0.85
Rs147093415 4	E527 D	Tolerat ed	0.09	3.28	Possibly Damagin g	0.911	Neutral	-2.451	neutral	-42	Probably Damagin g	0.78
Rs117731059 8	P528 S	Tolerat ed	0.77	3.28	Probably Damagin g	0.997	Deleter ious	-3.713	neutral	-72	Probably Damagin g	0.78
Rs562042369	Q529 L	Deleter ious	0.01	3.30	Possibly Damagin g	0.535	Deleter ious	-4.964	neutral	-4	Probably Damagin g	0.74
Rs754707860	G533 R	Deleter ious	0.00	3.57	Probably Damagin g	1.000	Deleter ious	-2.996	effect	9	Probably Damagin g	0.74

Résumé

Puisque CTLA-4 agit comme un facteur de régulation vital pour certaines réponses immunitaires, toute variation génétique dans le gène CTLA-4 peut influencer la fonction immunitaire normale et ensuite modifier le risque de cancer. Par conséquent, la recherche de l'impact de ces variations génétiques dans le gène CTLA-4 pourrait déterminer leur relation avec la susceptibilité au cancer. Pour ce faire, des outils d'analyse *in silico* de biomarqueurs a été utilisé pour étudier les polymorphismes nucléotidiques simples non synonymes délétères (nsSNP) afin de prédire les altérations dommageables et potentielles sur les propriétés de la protéine CTLA-4 et sur les protéines qui ont une relation avec CTLA-4, en particulier la protéine SRC.

Cinq outils *in silico* (SIFT, Polyphen2, PROVEAN, SNAP2, PANTHER) ont été utilisés pour estimer les SNP délétères. Ensuite les SNPs ont été soumis à l'analyse fonctionnel par les outils InterPro et PMut. Tandis que le serveur web I-Mutant3.0 a été utilisé pour déterminer les effets de la substitution des acides aminés sur la stabilité des protéines. La conservation évolutive des résidus d'acides aminés des protéines étudiés a été analysée par ConSurf.

A partir de 99 nsSNPs appartenant au CTLA-4 et 266 nsSNPs au gène SRC, 4 nsSNP de CTLA-4 et 14 pour le gène SRC ont été prédits comme étant à des mutations à haut risque.

Sur la base des résultats de cette étude, nous avons pu conclure que les substitutions délétères de la protéine CTLA-4 (T72I, N145H, N145S, T147A) et de la protéine Src (P136R, D407N, T460K, P487L, R509W, P510A, P210S, G173V, F223L, A296S, A330D, M344L, T432M, M498L) peuvent être des candidats importants pour le cancer colorectal.

Mots-clés: CTLA-4, SRC, nsSNP, cancer colorectal, analyse *in silico*.

Abstract

Since CTLA-4, acts as a vital regulatory factor for certain immune responses, any genetic variation in the CTLA-4 gene may influence normal immune function and subsequently alter cancer risk. Therefore, research into the impact of these genetic variations in the CTLA-4 gene could determine their relationship with cancer susceptibility. To this end, *in silico* biomarker analysis tools were used to study deleterious single non-synonymous nucleotide polymorphisms (nsSNPs) to predict damaging and potential alterations in the properties of the CTLA-4 protein and in proteins that have a relationship with CTLA-4, in particular the SRC protein.

Five *in silico* tools (SIFT, Polyphen2, PROVEAN, SNAP2, PANTHER) were used to estimate deleterious SNPs. Then the SNPs were subjected to functional analysis by the InterPro and PMut tools. While the I-Mutant3.0 web server was used to determine the effects of amino acid substitution on protein stability. The evolutionary conservation of amino acid residues of the studied proteins was analysed by ConSurf.

From 99 nsSNPs belonging to CTLA-4 and 266 nsSNPs belonging to the SRC gene, 4 nsSNPs of CTLA-4 and 14 for the SRC gene were predicted to be high risk mutations.

Based on the results of this study, we were able to conclude that deleterious substitutions in CTLA-4 (T72I, N145H, N145S, T147A) and Src (P136R, D407N, T460K, P487L, R509W, P510A, P210S, G173V, F223L, A296S, A330D, M344L, T432M, M498L) may be important candidates for colorectal cancer.

Keywords: CTLA-4, SRC, nsSNP, colorectal cancer, *in silico* analysis.

ملخص

يمكن أن يؤثر على الوظيفة المناعية الطبيعية وبالتالي يغير CTLA-4 يعمل كعامل تنظيمي حيوي لبعض الاستجابات المناعية ، فإن أي اختلاف جيني في جين CTLA-4 نظرًا لأن يمكن أن يحدد علاقتها بقابلية الإصابة بالسرطان. للقيام بذلك، تم استخدام أدوات CTLA-4 خطر الإصابة بالسرطان. لذلك ، فإن التحقيق في تأثير هذه الاختلافات الجينية في جين (من أجل التنبؤ بالتغيرات الضارة والمحتملة في خصائص بروتين nsSNPs تحليل المرقم الحيوي في السيليكو لدراسة الأشكال غير المترادفة الضارة للنوكليوتيدات المفردة) SRC، ولا سيما بروتين CTLA-4 وفي البروتينات التي لها علاقة ب CTLA-4

لتحليل وظيفي (SNPs) لتقدير تعدد الأشكال الضار. ثم خضعت PANTHER وSNAP2 وPROVEAN وPolyphen2 وSIFT تم استخدام خمسة أدوات في السيليكو (لتحديد تأثيرات استبدال الأحماض الأمينية على استقرار البروتين. تم تحليل الحفظ التطوري لبقايا I-Mutant3.0. بينما تم استخدام خادم الويب PMut وInterPro بواسطة أدوات ConSurf. الأحماض الأمينية للبروتينات المدروسة بواسطة

طفرات عالية الخطورة. SRC و14 لجين CTLA-4 من nsSNPs، تم توقع أن تكون 4 SRC إلى جين nsSNP و266 CTLA-4 التي تنتمي إلى nsSNPs من 99

، سرطان القولون والمستقيم، تحليل السيليكو، nsSNP، SRC، CTLA-4 الكلمات المفتاحية: T72I، N145H، N145S، T147A) و بروتين Src (P136R، D407N، T460K، P487L، R509W، P510A، P210S، G173V، F223L، A296S، A330D، M344L، T432M، M498L) بناءً على نتائج هذه الدراسة، تمكنا من استنتاج أن البدائل الضارة لبروتين