



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



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

Département de Biologie

Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et d'Immunologie W04144100

MEMOIRE

Présenté par

BENLALDJ Amel

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Immunologie

Thème

Conception des amorces du gène *NOS2* exprimé par le macrophage M1 au cours de l'inflammation, l'auto-immunité, l'allergie respiratoire et l'immunité anti-infectieuse.

Soutenu le 07 Septembre 2020, devant le jury composé de :

Président	ARIBI Mourad	Professeur	Université de Tlemcen
Encadrante	NOUARI Wafa	MCB	Université de Tlemcen
Examinatrice	MILIANI Marwa	MAB	Université de Tlemcen

Année universitaire 2019/2020

Résumé

Introduction : Les macrophages, cellules de l'immunité innée, sont impliqués dans les processus inflammatoires en produisant plusieurs médiateurs inflammatoires. Ces cellules expriment l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS ou *NOS2*), une enzyme qui permet la production du monoxyde d'azote (NO). Ce médiateur permet, d'une part, d'éliminer les infections par son effet microbicide, et d'autre part, de favoriser la progression des maladies auto-immunes et les allergies respiratoires.

Objectif : Concevoir une paire d'amorce encadrant une partie du gène *NOS2* exprimé par le macrophage M1 au cours de l'inflammation, l'auto-immunité, l'allergie respiratoire et l'immunité anti-infectieuse.

Matériels et méthodes : La séquence du gène *NOS2* a été obtenue grâce à la base de données « Ensembl ». Puis, les amorces ont été conçues à l'aide de l'outil « Primer-BLAST » du site NCBI.

Résultats : Un couple d'amorce spécifique qui présente des caractéristiques optimales pour le bon déroulement d'une PCR et qui donne un seul produit spécifique de 604 pb a été choisi.

Conclusion : En conclusion, les amorces obtenues peuvent être utilisées pour l'étude de l'expression du gène *NOS2* dans diverses études ultérieures.

Mots clés : Amorces, Gène *NOS2*, Macrophage M1, PCR, Primer-BLAST.

Abstract

Introduction: Macrophages, cells of innate immunity, are involved in inflammatory processes by producing several inflammatory mediators. These cells express inducible nitric oxide synthase (iNOS or *NOS2*), an enzyme that enables the production of nitric oxide (NO). This mediator allows, on the one hand, to eliminate infections through its microbicidal effect, and on the other hand, to promote the progression of autoimmune diseases and respiratory allergies.

Objective: Design a primer pair flanking part of the *NOS2* gene expressed by the M1 macrophage during inflammation, autoimmunity, respiratory allergy, and anti-infective immunity.

Materials and methods: The sequence of the *NOS2* gene was obtained using the "Ensembl" database. Then, the primers were designed using "Primer-BLAST" software from the NCBI site.

Results: A pair of specific primers that exhibit optimal characteristics for the success of a PCR and which gives a single specific product of 604bp was chosen.

Conclusion: In conclusion, the primers obtained can be used for the study of the expression of the *NOS2* gene in various subsequent studies.

Keywords: *NOS2* Gene, Macrophage M1, PCR, Primers, Primer-BLAST.

ملخص

المقدمة: تشارك الخلايا البالعة، خلايا المناعة الطبيعية، في الالتهاب عن طريق إنتاج العديد من وسطاء الالتهاب. هذه الخلايا تعبر عن سينثاز أكسيد النيتريك المستحث (iNOS أو NOS2)، وهو إنزيم ينتج إنتاج أكسيد النيتريك (NO). يسمح هذا الوسيط، من ناحية، بالقضاء على الالتهابات من خلال تأثير مبيد الجراثيم، ومن ناحية أخرى، لتعزيز تطور أمراض المناعة الذاتية والحساسية التنفسية.

الهدف: تصميم زوج من البرايمرز يحيط بجزء من الجين NOS2 معبر عنه بواسطة الخلايا البالعة M1 أثناء الالتهاب، المناعة الذاتية، الحساسية التنفسية، والمناعة المضادة للعدوى.

المواد والطرق: تم الحصول على تسلسل الجين NOS2 من قاعدة بيانات «Ensembl»، ثم تم تصميم البرايمر باستخدام برنامج «Primer-BLAST».

النتائج: تم اختيار زوج من البرايمر المحددة التي تتمتع بخصائص مثالية لنجاح PCR وتعطي منتجًا واحدًا محددًا يبلغ 604pb.

الخلاصة: يمكن استخدام البادئات التي تم الحصول عليها لدراسة الجين NOS2 في دراسات لاحقة مختلفة.

كلمات البحث: الخلايا البالعة M1، البرايمر، الجين NOS2، Primer-BLAST، PCR.

Avant-propos

En premier lieu, je remercie ALLAH le tout puissant de m'avoir guidé et donné la force et le courage d'aller jusqu'au bout de mes études.

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et d'Immunologie (BIOMOLIM), Université de Tlemcen, sous la direction du Professeur Mourad ARIBI, qui m'a accueilli au sein de son laboratoire à qui j'adresse mes sincères remerciements.

Mes vifs remerciements à mon encadrante Dr. Wafa NOUARI, maître de conférences de classe B au département de Biologie- Université de Tlemcen, d'avoir dirigée mes travaux et m'avoir apportée une aide précieuse en ces moments difficiles par ses précieux conseils et ses orientations.

Je tiens à remercier les membres du jury, d'avoir accepté d'évaluer ce travail et de me consacrer un peu de leur temps, malgré leurs obligations professionnelles

J'exprime aussi ma sincère gratitude à tous mes enseignants pour leurs soutiens et leurs conseils durant mon cursus universitaires.

Je tiens aussi à remercier toute l'équipe du Laboratoire BIOMOLIM et toute la promotion MASTER 2 immunologie 2019/2020 et toute personne qui m'a apportée son soutien de près ou de loin durant la réalisation de ce travail.

Je dédie ce modeste travail à ma très chère mère, qui est mon symbole de force et de courage et sans qui je ne serais pas celle qui je suis aujourd'hui et à mon très cher frère Abdennacer. Je les remercie pour tout le soutien et l'amour qu'ils me portent et qu'ALLAH les garde pour moi.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
Abstract	iv
Résumé en Arabe	v
Avant-propos	vi
Table des matières	vii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations	x
Introduction	1
Chapitre 1. Revue de la littérature	2
1.1. Macrophage	2
1.1.1. Généralités	2
1.1.2. Origine des macrophages	2
1.1.3. Phénotypes	4
1.1.3.1. Macrophages M1	4
1.1.3.2. Macrophages M2	5
1.2. Oxyde Nitrique Synthase Inductible (iNOS)	6
1.2.1. Généralités	6
1.2.2. Le gène d'iNOS	7
1.2.3. Régulation de l'expression de l'iNOS	7
1.2.3.1. Régulation transcriptionnelle	7
1.2.3.2. Régulation post-transcriptionnel	8
1.2.4. Polymorphisme du gène iNOS	8
1.2.5. Structure de l'iNOS	8
1.2.6. Fonctions	9
1.2.6.1. Biosynthèse du Monoxyde d'azote (NO)	9
1.2.7. L'iNOS dans l'inflammation	10
1.2.8. L'iNOS dans l'immunité anti-infectieuse	11
1.2.9. L'iNOS dans l'auto-immunité	12
1.2.10. L'iNOS dans l'allergie respiratoire	13
1.3. La Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)	14
1.3.1. Définition	14
1.3.2. Principe de la PCR	14
1.3.3. Les composants de la PCR	14

1.3.4. Les étapes de la PCR	16
1.3.4.1. Etape 1 – la dénaturation	16
1.3.4.2. Etape 2 – l'hybridation	16
1.3.4.3. Etape 3 – l'élongation	16
1.4. Choix des amorces de PCR	19
1.4.1. Critères de choix de bonnes amorces	19
1.4.2. Outils de conception des amorces	19
1.5. Problématique et objectifs	20
1.5.1. Problématique	20
1.5.2. Objectifs	20
1.5.3. But	20
Chapitre 2. Matériels et méthodes	21
2.1. Conception des amorces pour le gène <i>NOS2</i>	21
2.1.1. Recherche de la séquence du gène <i>NOS2</i>	21
2.1.2. Le design des Primers : outil Primer-Blast	23
2.1.3. Confirmation des résultats : <i>in-silico</i> PCR	25
Chapitre 3. Résultats	27
3.1. Résultats de la conception des amorces	27
3.1.2. Résultats du Primer-BLAST	27
3.1.2. Résultats de la confirmation par <i>In-silico</i> PCR	30
Chapitre 4. Conclusions et perspectives	31
Chapitre 5. Bibliographie	32

Liste des figures

Figure 1.1. Origine des macrophages.	3
Figure 1.2. Polarisation des macrophages.	6
Figure 1.3. Localisation de gène <i>NOS2</i> .	7
Figure 1.4. Régulation de l'expression de l'iNOS.	8
Figure 1.5. Structure moléculaire de l'homo-dimère iNOS.	9
Figure 1.6. Biosynthèse du NO.	10
Figure 1.7. Représentation schématique de la réaction de polymérisation en chaîne.	18
Figure 2.1. Plateforme de la base de données Ensembl.	21
Figure 2.2. Résultats de la recherche du gène <i>NOS2</i> .	21
Figure 2.3. Caractéristiques du gène <i>NOS2</i> .	22
Figure 2.4. La séquence du gène <i>NOS2</i> depuis la plateforme « Ensembl ».	22
Figure 2.5. La séquence d'intérêt.	23
Figure 2.6. Plateforme de la base de données NCBI.	23
Figure 2.7. L'outil Primer-BLAST.	24
Figure 2.8. L'Outil Primer-BLAST.	24
Figure 2.9. Primer Pair Specificity Checking Parameters.	25
Figure 2.10. Confirmation des résultats par la plateforme « UCSC genome browser ».	26
Figure 3.1. Les amorces.	27
Figure 3.3. Primer pair 4.	28
Figure 3.4. Primer pair 9.	28
Figure 3.5. Résultat du Primer-BLAST.	29
Figure 3.6. Les amorces encadrant la région d'intérêt.	29
Figure 3.7. Résultats de la confirmation.	30

Liste des abréviations**A**

<i>A :</i>	<i>Adénine</i>
<i>A2R :</i>	<i>A2 adenosine receptor</i>
<i>ADN :</i>	<i>Acide désoxyribonucléique</i>
<i>ADNsb :</i>	<i>Acide désoxyribonucléique simple brin</i>
<i>AP-1 :</i>	<i>Activator protein 1</i>
<i>ARG1 :</i>	<i>Arginase 1</i>
<i>ARNm :</i>	<i>Acide ribonucléique messenger</i>
<i>ATP :</i>	<i>Adénine tri-phosphate</i>

B

<i>BH4 :</i>	<i>5,6,7,8-tétrahydrobioptérine</i>
--------------	-------------------------------------

C

<i>C° :</i>	<i>Celsius</i>
<i>C :</i>	<i>Cytosine</i>
<i>CAM :</i>	<i>Calmoduline</i>
<i>CCL2 :</i>	<i>CC chemokine ligand</i>
<i>CD :</i>	<i>Clusters de différenciation</i>
<i>C/EBP-α :</i>	<i>CCAAT / protéine de liaison à l'activateur α</i>
<i>CMH II :</i>	<i>Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II</i>
<i>cNOS :</i>	<i>NOS constitutive</i>
<i>CTP :</i>	<i>Désoxy cytosine tri-phosphate</i>
<i>CXCL :</i>	<i>Cystéine-acide aminé quelconque-cystéine ligand</i>

D

<i>DC :</i>	<i>Cellules dendritiques</i>
<i>dNTP :</i>	<i>Désoxy-nucléotides tri-phosphates</i>

E

eNOS : *NOS endothéliale*

F

FAD : Di-nucléotide d'adénine de flavine

FMN : Mono-nucléotide de flavine

Fizz1 : *Resistin-like- α*

G

G : Guanine

GM-CSF : *Granulocyte Macrophage colony-stimulating factor*

GTP : Désoxy guanine tri-phosphate

H

H₂O : Monoxyde de dihydrogène

HEME : Cofacteurs protoporphyrine IX

HSV-1 : Herpès simplex virus type 1

HuR : *Human antigen R*

I

IBD : *Inflammatory bowel disease*

IFN : Interféron

IL : Interleukine

iNOS : Inductible nitric oxide synthase

IRF : *Interferon regulatory factor*

K

KLF4 : *Krüppel-like factor-4*

KSRP : *KH-type splicing regulatory protein*

L

LED : Lupus érythémateux disséminé

Leu : Leucine

LPS : Lipopolysaccharide

M

M. tuberculosis :	<i>Mycobactérium tuberculosis</i>
M1 :	Macrophage classiquement activé/pro-inflammatoire
M2 :	Macrophage alternativement activé/anti-inflammatoire
MCP1 :	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
M-CSF :	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
Mg 2+ :	Magnésium
MPS :	<i>Mononuclear phagocyte system</i>
MRC1 :	<i>Mannose receptor, C type 1</i>

N

NADPH :	Nicotinamide-adenine- dinucleotide phosphate
NCBI :	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF-κB :	Facteur nucléaire kappa B (<i>Nuclear factor-kappa B</i>)
NK :	Natural killer
nNOS :	NOS neuronale
NO :	Monoxyde d'azote (Nitric oxide)
NO- :	Anion nitroxyl
NOS2 :	NO synthase
Nt :	Nucléotide

O

O2 :	Dioxygène
O2- :	Superoxyde
OONO- :	Anion peroxydinitrite

P

PABP :	<i>Poly(A) binding protein</i>
PCR :	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PR :	Polyarthrite rhumatoïde

PRR :	<i>Pattern recognition receptor</i>
PPAR γ :	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor γ</i>
Q	
q-PCR :	PCR Quantitative
R	
ROS :	Espèces réactives de l'oxygène (<i>Reactive oxygen species</i>)
RT-PCR :	<i>Reverse transcriptase PCR</i>
S	
s :	Seconde
SEP :	Sclérose en plaques
Ser :	Sérine
SNC :	Système nerveux central
SNP :	<i>Single nucleotide polymorphisms</i>
STAT :	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
T	
T :	Thymidine
Th1 :	Lymphocyte T helper de type 1
Th2 :	Lymphocyte T helper de type 2
Tm :	Temperature de fusion (<i>Melting Temperature</i>)
TNF :	Facteur de nécrose tumorale (<i>Tumor necrosis factor</i>)
TGF- β :	<i>Transforming Growth Factor-beta</i>
TTP :	<i>RNA-binding protein tristetraprolin</i>
TTP :	Désoxy thymine tri-phosphate
Y	
Ym1 :	<i>Chitinase 3-like 3/-like protein</i>

Introduction

Les macrophages, des phagocytes mononucléaires, sont considérés comme l'une des premières lignes de défense du système immunitaire (Khan et *al.*, 2019; Wu et *al.*, 2017). Ils présentent une plasticité élevée. En réponse à divers stimuli, ces cellules peuvent se différencier en deux phénotypes distincts, les macrophages classiquement activés (M1), et les macrophages alternativement activés (M2) (Wang et *al.*, 2019). Les macrophages M1 sécrètent des médiateurs pro-inflammatoires (Wang et *al.*, 2014) et sont associés à des activités inflammatoires, microbicides et tumoricides (Wang et *al.*, 2019). En revanche, les macrophages M2 produisent des cytokines et des chemokines impliquées dans la réponse anti-inflammatoire et favorisent la réparation des tissus (Wu et *al.*, 2017).

L'iNOS est une enzyme oxydoréductase codée par le gène *NOS2*. Elle fait partie d'une classe d'enzymes des oxydes nitriques synthases (NOS) qui génèrent le NO en catalysant la conversion de la L-Arginine en L-Citrulline et NO (Kumar et *al.*, 2010). Cet enzyme est exprimée par les macrophages et est régulée en réponse à des cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α), l'interféron-gamma (IFN- γ) et l'interleukine-1 bêta (IL-1 β) (Iijima et *al.*, 2005) et aussi à des stimuli bactériens comme le lipopolysaccharide (LPS). Elle a été étroitement associée aux processus inflammatoires qui suivent une infection, une maladie ou des lésions tissulaires (Arnhold et *al.*, 2004).

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une méthode qui permet l'amplification des gènes d'intérêts *in vitro* afin de pouvoir les étudier et les analyser (Shahi et *al.*, 2018; Yilmaz et *al.*, 2012). Le développement de la PCR a produit d'énormes avantages dans les études d'expression génique et le diagnostic de diverses maladies (Shahi et *al.*, 2018). Elle implique trois étapes : la dénaturation, l'hybridation et l'élongation (Yilmaz et *al.*, 2012). Pour le bon déroulement de ces étapes elle a besoin du gène d'intérêt, d'une paire d'amorces, d'une enzyme ADN polymérase et de désoxyribonucléotides triphosphates libres (dNTP) (Shahi et *al.*, 2018).

L'efficacité et la sensibilité de la PCR dépendent d'une grande partie de l'utilisation d'une bonne paire d'amorces. Des amorces mal conçues peuvent entraîner une amplification non spécifique du gène cible et ainsi à l'échec de la PCR.

Ainsi, cette étude a pour objectif de concevoir des amorces du gène *NOS2* exprimé par les macrophages M1 au cours l'inflammation et l'auto-immunité, l'allergie respiratoire et l'immunité anti-infectieuse.

Chapitre 1. Revue de littérature

1.1. Macrophage

1.1.1. Généralités

Le mot Macrophage signifie « macro = grand et phage = mangeur ». Ce terme a été premièrement introduit à la fin du XIXe siècle par l'immunologiste Elie Metchnikoff (Shapouri-Moghaddam et *al.*, 2018).

Les macrophages sont l'un des éléments essentiels du système immunitaire, présents dans la plupart des tissus et organes (Mukherjee et *al.*, 2018; Wynn et *al.*, 2013). Ils constituent la première ligne de défense contre les agents pathogènes par la phagocytose des particules microbiennes et des cellules mortes (Verdeguer and Aouadi, 2017). Ils sont aussi impliqués dans les maladies inflammatoires et auto-immunes chroniques et initient la réponse immunitaire adaptative par la présentation d'antigène (s) aux cellules T naïves (Di Benedetto et *al.*, 2019). En plus de la protection immunitaire, les macrophages ont des fonctions supplémentaires telles que la participation à l'homéostasie tissulaire (Verdeguer and Aouadi, 2017).

Ces cellules appartiennent au système phagocytaire mononucléaire (MPS), une famille de phagocytes professionnels composée de cellules monocytes et de cellules dendritiques d'origine monocyttaire (Alikhan and Ricardo, 2013).

1.1.2. Origine

Trois principales sources peuvent être à l'origine des macrophages tissulaires :

- i) Le sac vitellin dans l'embryon comme source de cellules progénitrices par hématopoïèse primitive ;
- ii) Le foie fœtal où l'hématopoïèse a lieu s'est déplacée du sac vitellin ;
- iii) Et la moelle osseuse qui devient le centre hématopoïétique, induit chez les embryons tardifs et les organismes adultes (Dey et *al.*, 2015; Parisi et *al.*, 2018).

Dans le premier et deuxième cas : les macrophages résidants dans les tissus proviennent du sac vitellin ou de progéniteurs dérivés du foie fœtal (Wynn et *al.*, 2013). Ils sont produits pendant le développement embryonnaire avant que l'hématopoïèse définitive ne soit établie et cela bien avant la naissance (Shapouri-Moghaddam et *al.*, 2018; Orecchioni et *al.*, 2019). Ces macrophages ont des capacités d'auto-renouvellements et ont une signature d'expression génique différente des macrophages dérivés de la moelle osseuse (Orecchioni et *al.*, 2019).

Dans le troisième cas : les monocytes dérivés de progéniteurs hématopoïétiques de la moelle osseuse vont être libérés dans la circulation sanguine et par la suite vont être recrutés vers divers tissus du corps (Parisi et *al.*, 2018) où ils se différencient sous l'influence de facteurs de croissance spécifiques dont le facteur de stimulation des colonies de macrophages (M-CSF, *Macrophage colony-stimulating factor*) et le facteur de stimulation des colonies de macrophages granulocytes (GM-CSF, *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) en macrophages (Juhas et *al.*, 2015).

En fonction de leur localisation au niveau d'un tissu ou un organe, Les macrophages tissulaires s'adaptent au microenvironnement local et peuvent prendre différents noms, y compris les microglies [système nerveux central (SNC)], les cellules Kupffer (foie), les macrophages alvéolaires (poumon), les ostéoclastes (os), les histiocytes (rate et tissu conjonctif), les cellules de Langerhans (peau) et les macrophages tissulaires dans l'intestin (Gordon et *al.*, 2014). Les macrophages résidents favorisent l'homéostasie tissulaire, tandis que les macrophages monocytes aident principalement à la défense de l'hôte. Outre ces différences, il a été observé que les macrophages embryonnaires et adultes coexistent dans différents organes (Fig 1.1) (Davies et *al.*, 2013; Ruytinx et *al.*, 2018).

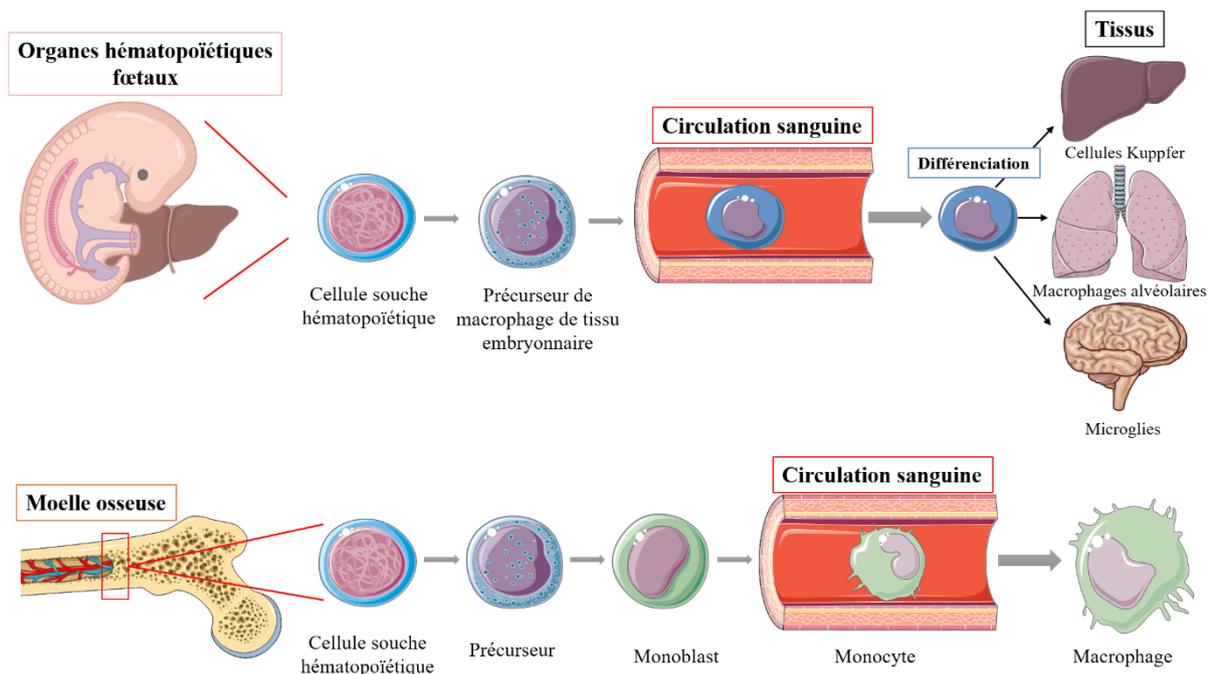


Figure 3.1. Origine des macrophages (D'après Abbas et *al.*, 2015). Les macrophages résidant dans les tissus, qui se différencient en formes spécialisées dans des organes particuliers, sont dérivés de précurseurs dans le sac vitellin et le foie fœtal pendant le développement embryonnaire. Les monocytes qui proviennent des précurseurs de la lignée myéloïde dans la moelle osseuse, vont être libérés dans la circulation sanguine et sont recrutés dans les tissus lors de réactions inflammatoires, où ils se différencient en macrophages.

1.1.3. Phénotypes

Les macrophages sont composés de population de cellules divers. Ils présentent une plasticité et peuvent modifier leurs profils fonctionnels et phénotypiques selon différents stimuli induits à la suite de processus inflammatoires ou pathologiques et de différentes cytokines libérées par les cellules T helper (Th1 et Th2) (Wang et al., 2014b; Juhas et al., 2015). Ils sont divisés en deux phénotypes distincts suivant la terminologie lymphocytaire Th1 et Th2 : les macrophages classiquement activés (M1) et les macrophages alternativement activés (M2) (Shapiro et al., 2011).

1.1.3.1. Macrophages M1

Les macrophages M1 ont un profil pro-inflammatoire grâce à leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Chávez-Galán et al., 2015). Ils sont les premiers acteurs de défense contre les infections par différents agents pathogènes (Galván-Peña and O'Neill, 2014). Ils présentent un rôle dans l'immunité anti-tumorale et contribuent aussi aux lésions tissulaires en générant des agents microbicides (Rhee, 2016; Shapiro et al., 2011).

Les macrophages se différencient vers le profil M1 lorsqu'ils sont activés par trois principaux stimuli :

- i. L'interféron- γ (IFN- γ), sécrété principalement par d'autres types de cellules (cellules TH1, cellules T cytotoxiques et cellules natural killer (NK)) suite à des signaux d'infections (Billiau and Matthys, 2009);
- ii. Le motif PAMP : le lipopolysaccharide (LPS), un composant de la paroi cellulaire bactérienne (Edholm et al., 2017);
- iii. Et le facteur GM-CSF (Di Benedetto et al., 2019).

D'autres stimuli peuvent également induire des propriétés pro-inflammatoires tels que le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) (Di Benedetto et al., 2019).

A partir des voies de signalisations induites par ces ligands et leurs récepteurs, les macrophages M1 induisent l'expression d'un certain nombre de médiateurs inflammatoires dont les cytokines TNF- α , interleukine-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-12, IL-23, les chimiokines CCL2/MCP1, CCL5, CCL8, CXCL12, CXCL4 (Juhas et al., 2015; Shapiro et al., 2011). Ils assurent également la synthèse des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Covarrubias et al., 2013) et la production d'oxyde nitrique (NO), via une synthèse accrue de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) (Juhas et al., 2015).

Les macrophages M1 sont phénotypiquement caractérisés par l'expression de niveaux élevés de complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) et de molécules co-stimulatrices CD80/CD86, ainsi que du marqueur CD68 (Chávez-Galán et *al.*, 2015).

Parmi les facteurs de transcriptions qui sont impliqués dans la polarisation des macrophages M1, on peut citer : le facteur nucléaire kappa B (NF- κ B), la protéine activatrice 1 (AP-1), PU.1, CCAAT / protéine de liaison à l'activateur α (C/EBP- α), le transducteur de signal et activateur de transcription 1 (STAT1) ainsi que le facteur régulateur 5 de l'interféron (IRF5) (Juhas et *al.*, 2015).

1.1.3.2. Macrophages M2

Les macrophages activés par une voie opposée à la voie classique sont appelés M2 ou macrophages alternativement activés. Ils adoptent un profil anti-inflammatoire et contribuent à une série de processus physiologiques et pathologiques où ils exercent des fonctions antiparasitaires et jouent un rôle dans les réactions allergiques (Espinoza-Jiménez et *al.*, 2012). De plus, ils participent au remodelage des tissus et à l'angiogenèse (Takeuchi and Akira, 2011). Cependant, les M2 peuvent également faciliter la croissance tumorale (Ruytinx et *al.*, 2018).

Les macrophages M2 sont classés en 4 sous-types selon le type de stimuli qui les polarisent, les marqueurs qui les caractérisent et les fonctions qu'ils exercent. IL-4 ou IL-13 induisent le développement des M2a. Les complexes immunes ou l'agoniste des récepteur TLR ou IL-1 polarisent les M2b (Di Benedetto et *al.*, 2019). Les glucocorticoïdes, le TGF- β ou l'IL-10 stimulent les M2c (Cassetta et *al.*, 2011) et les M2d sont activés en réponse à l'IL-6 et l'agoniste du récepteur A2 de l'adénosine (A2R) (Di Benedetto et *al.*, 2019).

Le phénotype des macrophages M2 est également favorisé par plusieurs facteurs de transcription, dont IRF4, C/EBP- β , le facteur 4 de type Krüppel (KLF4), STAT6 et le récepteur PPAR γ (récepteur activé par les proliférateur de peroxysoxe γ) (Banerjee et *al.*, 2013).

Les macrophages M2 sont caractérisés par la production de cytokines anti-inflammatoires, l'IL-4, l'IL-10, l'IL-33, le TGF- β et produisent aussi des agonistes des récepteurs de l'IL-10 (IL-1RA) (Di Benedetto et *al.*, 2019), ainsi que par l'expression des chimiokines comme le CCL1, CCL17, CCL18, CCL22 et CCL24 (Wang et *al.*, 2019a; Tiemessen et *al.*, 2007; Locati et *al.*, 2013). A l'inverse des macrophages M1, ils ont une expression de l'iNOS très limitée et produisent des niveaux de NO beaucoup plus faible (Kovacevic et *al.*, 2017). Les M2 sont phénotypiquement caractérisés par l'expression du récepteur de mannose (MRC1/CD206), resistin-like- α (Fizz1), chitinase 3-like 3-like protein (Ym1) (Liu et *al.*, 2014) et l'enzyme arginase 1 (ARG1), qui hydrolyse la L-arginine en L-ornithine + urée (Mantovani et *al.*, 2002).

L'exposition de macrophages M2 à des signaux M1, ou vice versa, induira une repolarisation, c'est-à-dire les macrophages M1 et M2 peuvent être convertis l'un à l'autre dans leur microenvironnement spécifique (Fig 1.2) (Shapouri-Moghaddam *et al.*, 2018).

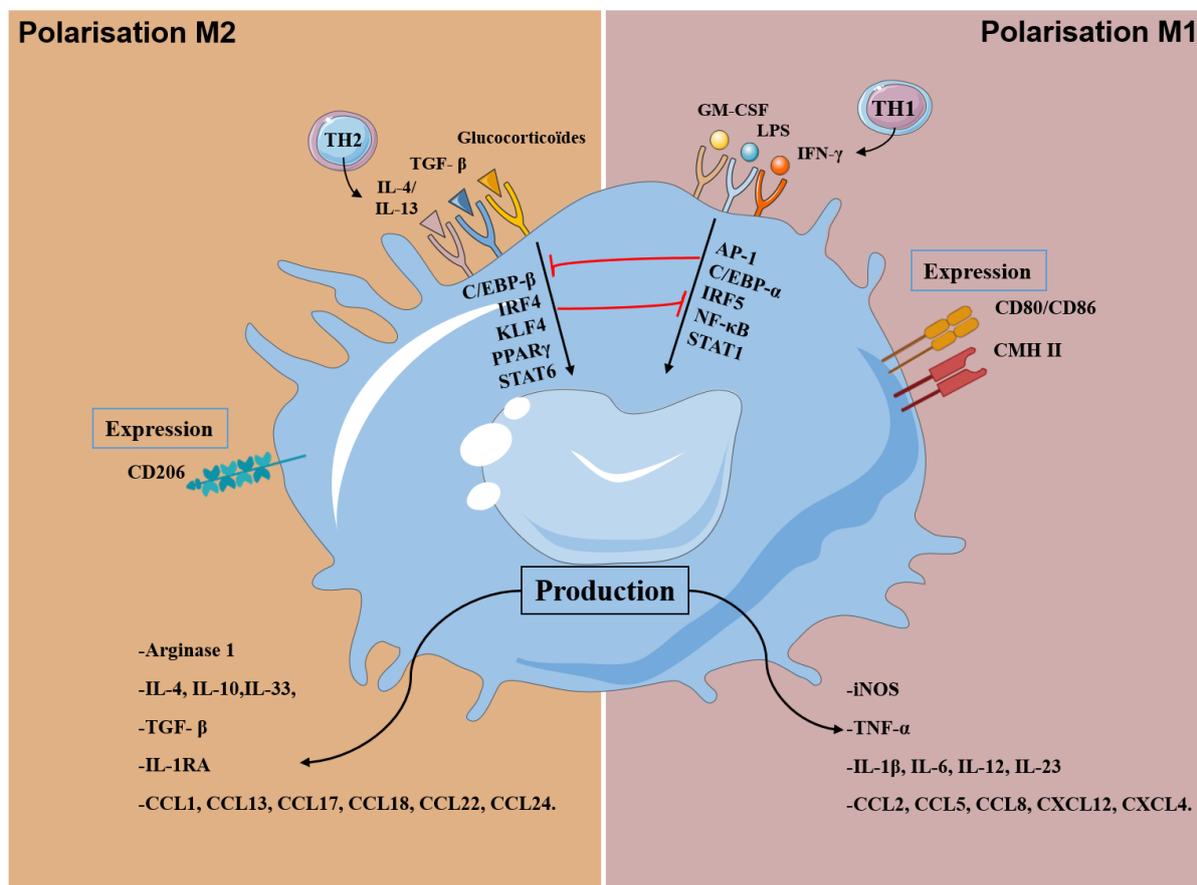


Figure 1.4. Polarisation des macrophages (Chávez-Galán *et al.*, 2015). Les macrophages M1, répondent à des stimuli tels que le LPS, l'IFN- γ et le GM-CSF et sont producteurs de cytokines pro-inflammatoires. Les macrophages M2, répondent à des stimuli tels que l'IL-4 ou l'IL-13 et sont producteurs de cytokines anti-inflammatoires. AP-1: *Activator protein 1*, CCL : CC chemokine ligand, CD : Clusters de différenciation, CMH II : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, C/EBP- α : CCAAT / protéine de liaison à l'activateur α , CXCL : Cystéine-acide aminé quelconque-cystéine ligand, GM-CSF : *Granulocyte Macrophage colony-stimulating factor*, IFN : Interféron, IL : Interleukine, iNOS : Inductible nitric oxide synthase, IRF : *Interferon regulatory factor*, KLF4 : *Krüppel-like factor-4*, LPS : Lipopolysaccharide, M1 : Macrophage classiquement activé/pro-inflammatoire, M2 : Macrophage alternativement activé/anti-inflammatoire, M-CSF : *Macrophage colony-stimulating factor*, NF- κ B : Facteur nucléaire kappa B, PPAR γ : *Peroxisome proliferator-activated receptor γ* , STAT : *Signal transducer and activator of transcription*, Th1 : Lymphocyte T helper de type 1, Th2 : Lymphocyte T helper de type 2, TGF- β : *Transforming Growth Factor-beta*, TNF : Facteur de nécrose tumorale.

1.2. Oxyde Nitrique Synthase Inductible (iNOS)

1.2.1. Généralités

La NOS inductible (iNOS, NOS2, NOSII) est l'une des trois isoformes appartenant à la famille d'enzymes des synthèses de l'oxyde nitrique (NOS) (Kielbik *et al.*, 2019). Cette famille se compose de NOS exprimées de manière constitutive, les cNOS qui impliquent ; la NOS endothélial (NOS1/ eNOS) et la NOS neuronale (NOS3/ nNOS) (Saha and Pahan, 2006) et les NOS inductible, qui ne sont pas exprimés dans les cellules en repos mais plutôt induits

(Aktan, 2004) dans différents types de cellules immunitaires tels que ; les macrophages, les cellules dendritiques, les neutrophiles (Sonar and Lal, 2019).

Ces enzymes sont responsables de la synthèse de l'oxyde nitrique (NO) à partir d'un substrat le L-arginine (Kielbik et *al.*, 2019). Parmi ces trois isoformes, l'iNOS est une molécule signature pour les macrophages M1 (Lu et *al.*, 2015). Son activité enzymatique est calcium indépendante et une fois exprimé, elle génère des niveaux élevés de NO qui joue un rôle important dans diverses conditions physiologiques et physiopathologiques (Lee et *al.*, 2017; Yu et *al.*, 2018).

1.2.2. Le gène d'iNOS

Le gène iNOS (*NOS2*) est localisé sur le chromosome 17 en position 17q11.2 chez l'humain (Jiao et *al.*, 2015). Il présente 80% de similarité avec le gène iNOS murin ainsi que 50% d'homologie avec le nNOS et le eNOS (Panaro et *al.*, 2003). Ce gène à une longueur de 37kb et comprend 27 exons avec le site de début de transcription dans l'exon 2 et le codon stop dans l'exon 27 (Yu et *al.*, 2018; Xu et *al.*, 1996). Il code pour 3 transcrit dont le transcrit NOS_201 qui mesure 4206 bp qui code pour une protéine de 1153 acides aminés avec une masse moléculaire de 131 kDa (Fig 1.3) (Kielbik et *al.*, 2019).

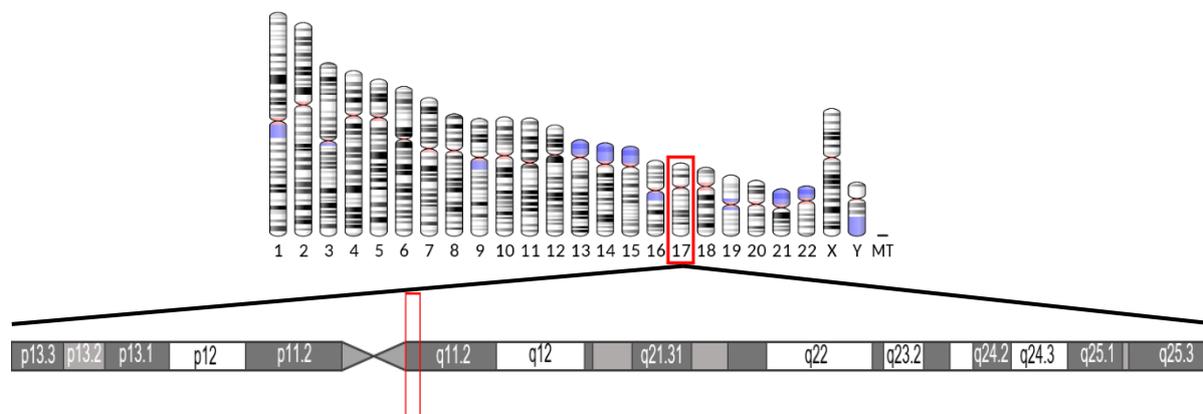


Figure 1.3. Localisation du gène *NOS2* (D'après NCBI, Genome Decoration Page). Localisation du gène *NOS2* sur le chromosome 17 humain en position 17q11.2 (en rouge).

1.2.3. Régulation de l'expression de l'iNOS

L'expression d'iNOS est un mécanisme complexe qui peut être régulé à plusieurs niveaux, principalement au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel, mais elle peut aussi être régulée au niveau traductionnel et au niveau post-traductionnel (Kielbik et *al.*, 2019).

1.2.3.1. Régulation transcriptionnelle

L'expression de l'iNOS est induite par plusieurs types de stimuli immunologiques et inflammatoires qui vont contrôler l'activité des facteurs de transcriptions (Guo and Geller, 2014). Parmi ces signaux, on cite principalement les cytokines pro-inflammatoires, IL-1 β , IFN-

γ et TNF-α ainsi que des produits bactériens dont le LPS (Kielbik et al., 2019). La régulation transcriptionnelle d'iNOS implique plusieurs facteurs de transcriptions dont NF-κB, STAT-1, AP-1 et C/EBPβ (Guo and Geller, 2014).

1.2.3.2. Régulation post-transcriptionnelle

L'expression de l'iNOS peut aussi être régulée post-transcriptionnellement *via* des mécanismes qui influencent la stabilité de l'ARNm à l'aide de protéine de liaison à l'ARN, HuR, TTP, KSRP et PABP (Fig 1.4) (Guo and Geller, 2014).

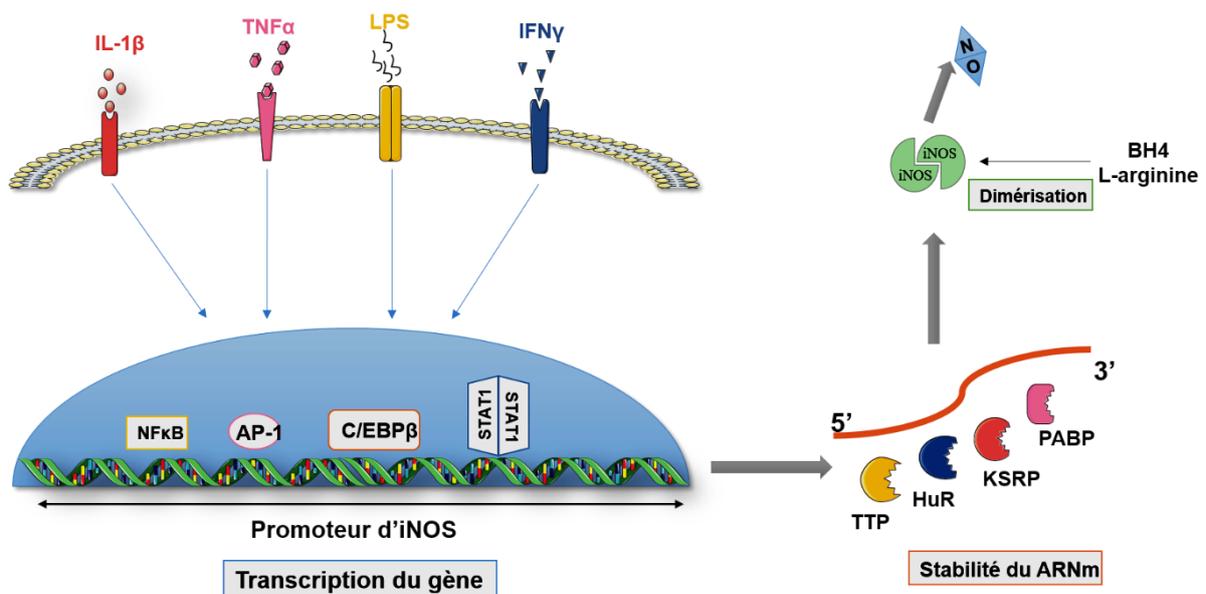


Figure 1.4. Régulation de l'expression de l'iNOS (D'après Lee et al., 2017). Mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels qui contrôlent l'expression et la fonction d'iNOS. La transcription d'iNOS est induite en synergie entre une combinaison de cytokines et / ou du LPS qui conduit à l'activation de multiples facteurs de transcription. L'expression d'iNOS est également régulée post-transcriptionnellement par des facteurs cellulaires qui affectent l'ARNm d'iNOS et la stabilité des protéines. ARNm : Acide ribonucléique messager, AP-1 : Activator protein 1, BH4 : 5,6,7,8-tétrahydrobioptérine, C/EBP-α : CCAAT / protéine de liaison à l'activateur α, HuR : Human antigen R, IFN : Interféron, IL : Interleukine, iNOS : Inductible nitric oxide synthase, KSRP : *KH-type splicing regulatory protein*, LPS : Lipopolysaccharide, NF-κB : Facteur nucléaire kappa B, NO : Monoxyde d'azote (Nitric oxide), PABP : *Poly(A) binding protein*, STAT : *Signal transducer and activator of transcription*, TNF : Facteur de nécrose tumorale (*Tumor necrosis factor*), TTP : *RNA-binding protein tristetraprolin*.

1.2.4. Polymorphisme du gène iNOS

Plusieurs polymorphismes ont été décrits au niveau de la séquence du promoteur iNOS et ont été corrélés avec diverses maladies pathologiques ainsi que leur relation avec l'expression et l'activité d'iNOS (Kielbik et al., 2019). Le gène iNOS présente à la fois des polymorphismes dans la région codante et régulatrice. Ceux de la région codante influencent l'activité des protéines, alors que ceux de la région régulatrice influencent le niveau du produit génique (Qidwai and Jamal, 2010). Parmi ces polymorphismes, on a les polymorphismes mono-

nucléotidiques (SNP) C150T (Leu Ser608) et les polymorphismes répétés penta-nucléotidiques (-CCTTT) (Jiao et al., 2015; Özenver and Efferth, 2020).

1.2.5. Structure de l'iNOS

La protéine iNOS est une enzyme catalytique oxydoréductase avec un poids moléculaire d'environ 130-135 kDa (Kielbik et al., 2019; Lee et al., 2017; Qidwai and Jamal, 2010) et elle est activée en tant qu'homo-dimère et chaque monomère se compose de deux domaines. Un domaine oxygénase N-terminal qui se lie aux cofacteurs protoporphyrine IX (hème) et la (6R-) 5,6,7,8-tétrahydrobioptérine (BH4) et contient un site de liaison pour le substrat L-arginine, ainsi qu'un domaine réductase C-terminal qui se lie aux cofacteurs di-nucléotide d'adénine de flavine (FAD), au mono-nucléotide de flavine (FMN) et aussi au substrat phosphate de di-nucléotide adénine de nicotinamide (NADPH) (Tejero and Stuehr, 2013). Chacun de ces domaines représente différentes parties fonctionnelles de l'enzyme.

Entre les domaines oxygénase et réductase, une courte séquence fournit un site de liaison pour la calmoduline qui se lie de manière non covalente au complexe iNOS (Lirk et al., 2002; Tejero and Stuehr, 2013).

L'iNOS monomère est incapable de se lier au cofacteur BH4 et au substrat L-arginine, il ne peut donc pas synthétiser le NO. Le processus d'homo-dimérisation, qui est requis pour l'activation enzymatique nécessite la disponibilité du L-arginine et du BH4. De plus, la présence d'hème semble être obligatoire pour la formation de dimères et pour stabiliser l'ensemble du complexe enzymatique (Fig 1.5) (Kielbik et al., 2019).

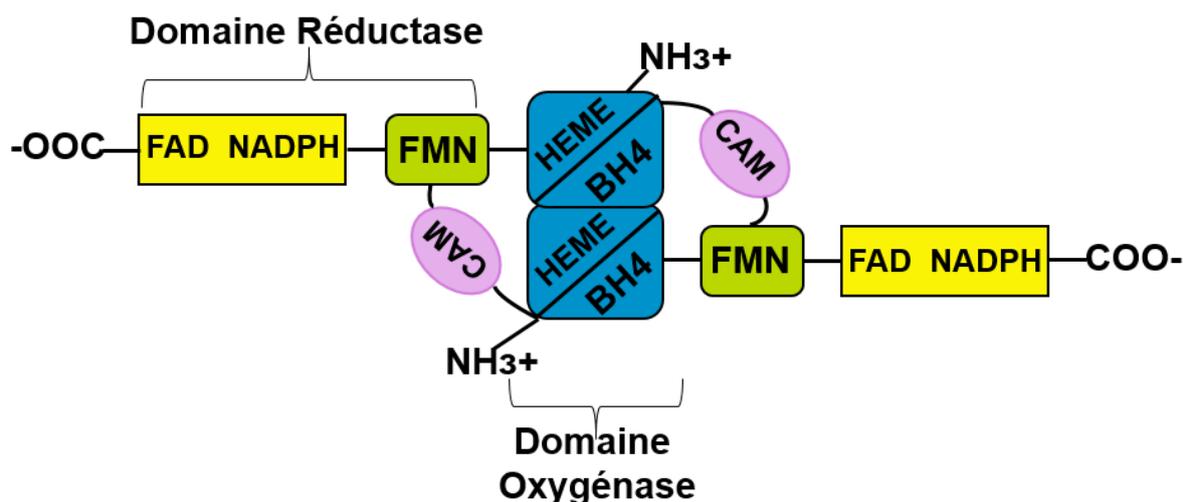


Figure 1.5. Structure moléculaire de l'homodimère iNOS (D'après Tejero and Stuehr, 2013). BH4 : 5,6,7,8-tétrahydrobioptérine, CAM : calmoduline, HEME : cofacteurs protoporphyrine IX, FAD : Di-nucléotide d'adénine de flavine, FMN : Mono-nucléotide de flavine, NADPH : Nicotinamide-adenine- dinucleotide phosphate.

1.2.6. Fonctions

1.2.6.1. Biosynthèse du Monoxyde d'azote (NO)

Le monoxyde d'azote, ou oxyde nitrique (NO, formule $.N = O$) est un simple radical libre gazeux (Lirk et al., 2002), une molécule de signalisation générée à partir de l'acide aminé L-arginine par l'enzyme iNOS (Soufli et al., 2016; Tejero and Stuehr, 2013). Le NO est impliqué dans plusieurs processus physiologiques et physiopathologiques. Ses effets diffèrent selon le taux, la durée, le lieu de production et la nature des molécules cibles (Soufli et al., 2016). Il joue un rôle dans la neurotransmission, la vasodilatation, la défense de l'hôte contre les agents pathogènes et dans la régulation immunitaire (Xue et al., 2018).

Dans les macrophages, le NO est responsable des réponses immunitaires antimicrobiennes et tumoricides (Jaffrey and Snyder, 1995). Il agit comme un effecteur de l'inflammation pour l'élimination des infections bactériennes et a un effet protecteur sur le corps (Xue et al., 2018). Mais aussi, il peut être impliqué dans les dommages tissulaires dans différentes maladies auto-immunes (Panaro et al., 2003).

L'iNOS synthétise le NO en deux étapes catalytiques : premièrement la L-arginine est hydroxylée par l'oxygène moléculaire (O_2) et le NADPH en N ω -hydroxy-L-arginine, puis est oxydée en L-citrulline, H_2O et NO (Kielbik et al., 2019). Cette réaction nécessite cinq électrons (Jaitovich and Jourd'heuil, 2017). L'iNOS transfère les électrons du NADPH, via les flavines FAD et FMN dans le domaine C-terminal réductase, à l'hème dans le domaine N-terminal oxygénase où ces électrons sont utilisés pour réduire et activer l' O_2 et pour oxyder la L-arginine en L-citrulline et NO (Fig 1.6) (Forstermann and Sessa, 2012).

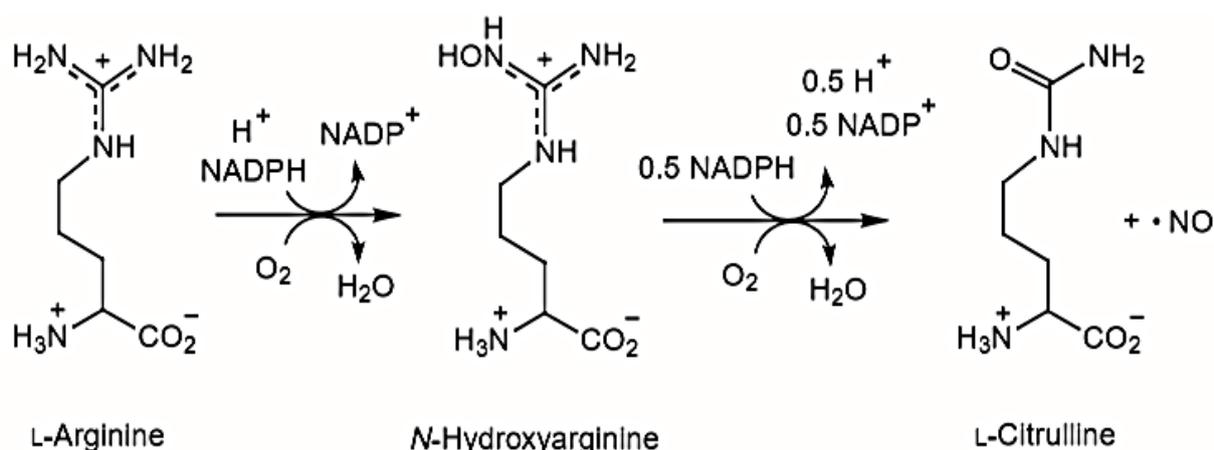


Figure 1.6. Biosynthèse du NO (Kröncke et al., 1995). Biosynthèse de NO à partir de L-Arginine catalysée par NO synthase inducible.

L'isoforme iNOS ne produit pas seulement du NO mais en combinaison avec un certain nombre d'espèces résultant de l'oxydation ou de la réduction du NO (Weigert and Brüne, 2008), il induit la production de nombreux réactifs d'azotes ainsi que des espèces réactives de l'oxygène nitrique (RNOS), par exemple, l'anion peroxy nitrite (OONO⁻), l'anion nitroxy (NO⁻) et le dioxyde d'azote (NO₂), responsables du stress oxydatif (Lechner et *al.*, 2005; Soufli et *al.*, 2016).

1.2.7. L'iNOS dans l'inflammation

L'inflammation est un processus de défense essentiel du système immunitaire déclenché en réponse à une infection ou une lésion tissulaires (Dunster, 2016). Elle est médiée par différentes cellules effectrices telles que les macrophages, les cellules dendritiques (DC) et les lymphocytes et est régulée par la production de diverses cytokines inflammatoires, de chimiokines et d'autres médiateurs inflammatoires (Dai et *al.*, 2009; Zamora et *al.*, 2000). Tout cela forment un réseau complexe qui détermine l'intensité et la durée de l'inflammation (Zamora et *al.*, 2000).

En revanche, un dérèglement dans ce processus peut conduire à une inflammation chronique qui entraîne de nouveaux dommages et de graves maladies inflammatoires telles que la maladie inflammatoire de l'intestin, l'asthme, la polyarthrite rhumatoïde, l'athérosclérose, les maladies neurodégénératives et le cancer (Dunster, 2016; Lind et *al.*, 2017; Medzhitov, 2010).

Parmi les cellules effectrices de l'inflammation, le macrophage exprime l'enzyme iNOS, un médiateur clé de la réponse immunitaire et de l'inflammation. En réponse à des cytokines inflammatoires et des stimuli bactériens, le macrophage produit l'oxyde nitrique (NO) qui est impliqué dans des fonctions régulatrices et assure la cytoprotection (Korhonen et *al.*, 2005; Minhas et *al.*, 2020). Cependant, l'iNOS peut aussi avoir des effets néfastes et toxiques. Une dérégulation ou une surexpression de l'iNOS est impliquées dans la physiopathologie de divers maladies notamment les maladies inflammatoires chroniques des voies respiratoires, des vaisseaux, de l'intestin, du rein, du cœur et de la peau (Cinelli et *al.*, 2020; Suschek et *al.*, 2004).

Dans les maladies inflammatoires de l'intestin (IBD), qui sont décrites comme une inflammation intestinale chronique causée par les interactions hôte-microbien chez un individu génétiquement sensible (Fakhoury et *al.*, 2014), la dérégulation de l'iNOS et la surproduction de NO font parties d'une réponse immunitaire dérégulée et sont étroitement associée à l'initiation et au maintien de l'inflammation intestinale dans les IBD (Baranipour et *al.*, 2018).

1.2.8. L'iNOS dans l'immunité anti-infectieuse

La fonction principale du système immunitaire est la défense contre les différents agents pathogènes et cela grâce à différentes cellules et mécanismes, comprenant l'immunité humorale et cellulaire (Sousa et *al.*, 2019).

Parmi les cellules qui représentent la première ligne de défense contre ces pathogènes envahissants, on cite les macrophages. Les macrophages résidents patrouillent les barrières épithéliales pour contrôler les envahisseurs infectieux (Weiss and Schaible, 2015). Une fois que les macrophages reconnaissent ces agents pathogènes par leurs récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) exposés en surface, une réponse inflammatoire sera déclenchée, ce qui comprendra la sécrétion de plusieurs types de médiateurs inflammatoires (Weiss and Schaible, 2015).

L'iNOS est souvent observée et exprimée dans les macrophages de patients atteints de maladies infectieuses (MacMicking et *al.*, 1997). Son principal rôle est la destruction des agents pathogènes envahisseurs microbiens et viraux (Bogdan, 2001; Chakravorty and Hensel, 2003). Son expression est premièrement induite par le LPS, un produit bactérien en synergie avec l'IFN- γ , ainsi que par d'autres produits de micro-organismes, notamment les virus, les bactéries, les protozoaires et les champignons, comme l'ADN bactérien, les acides nucléiques viraux ou les protéines de surface (Panaro et *al.*, 2003; Saha and Pahan, 2006).

Dans le cas d'une infection, l'iNOS produit des niveaux élevés du NO, ce qui confère aux macrophages une activité cytotoxique contre divers pathogènes (MacMicking et *al.*, 1997). Le NO joue un rôle essentiel dans la lutte contre les infections (Korhonen et *al.*, 2005). Parmi ces nombreuses fonctions : il est capable d'interagir avec l'ADN bactérien entraînant des ruptures de brins d'ADN et se lie aux protéines et aux lipides, inhibant ou tuant ainsi les agents pathogènes cibles (Schairer et *al.*, 2012). Il se diffuse aussi à travers les membranes cellulaires et provoque des dommages sur les agents pathogènes envahisseurs (Schairer et *al.*, 2012).

L'iNOS est détectée chez des patients présentant des infections par différents agents pathogènes tels que, des protozoaires et des parasites extracellulaires ou intracellulaires, (*Toxoplasma*, *Leishmania*, *Plasmodium*) (Shen et *al.*, 2017), des virus comme le virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) (Lucinda et *al.*, 2017) et aussi des bactéries dont *Mycobacterium tuberculosis* (Persichini et *al.*, 1997).

Au cours de la tuberculose, il a été observé que les macrophages expriment fortement l'iNOS et produisent une quantité importante du NO ce qui peut provoquer une apoptose des cellules hôtes, limiter la croissance de *Mycobacterium tuberculosis* (Bogdan, 2015) et aussi contrôler l'infection pulmonaire (Zamora et *al.*, 2000).

1.2.9. L'iNOS dans l'auto-immunité

Le système immunitaire est un ensemble de mécanismes et d'éléments qui participent à la reconnaissance du soi du non soi. Il est conçu pour reconnaître et détruire les agents pathogènes, les cellules et les tissus infectés ou transformés, sans pour autant affecter le soi (Rayner and Isaacs, 2018).

Dans l'auto-immunité, ces mécanismes sont altérés et la réponse immunitaire est dirigée contre le soi où il y'a la perte de la tolérance immunologique aux auto-antigènes (Anaya, 2010), provoquant ainsi un état inflammatoire et des lésions tissulaires qui peuvent être localisées ou généralisées (Qu et *al.*, 2014).

La majorité des lésions inflammatoires et auto-immunes sont caractérisées par une abondance de macrophages activés (Forstermann and Sessa, 2012). Des études ont montré que la surexpression d'iNOS produite par ces macrophages a une liaison avec les maladies auto-immunes (Pan et *al.*, 2020). Bien que l'iNOS et le NO aient divers rôles bénéfiques dans l'inflammation et les réponses anti-infectieuses, la dérégulation de l'iNOS et la libération incontrôlée du NO au mauvais site (Forstermann and Sessa, 2012; Miljkovic and Trajkovic, 2004) conduisent à une inflammation chronique, des lésions cellulaires et tissulaires et à la progression de ces maladies (Levesque and Weinberg, 2004).

L'iNOS a été observé dans la physiopathologie de plusieurs maladies inflammatoires auto-immunes dont la polyarthrite rhumatoïde (PR), la sclérose en plaques (SEP), le syndrome de Sjögren, la sclérodermie et le lupus érythémateux disséminé (LED) (Smallwood et *al.*, 2018; Suschek et *al.*, 2004). De plus, il a été rapporté que l'iNOS est régulé à la hausse dans les sites de tissus enflammés (Lee et *al.*, 2017) et est responsable de la plupart des dommages articulaires comme dans la PR et que le NO est l'un des mécanismes responsables des érosions osseuses dans cette maladie (Negi et *al.*, 2017).

1.2.10. L'iNOS dans l'allergie respiratoire

L'asthme allergique est une maladie inflammatoire chronique des voies respiratoires. Elle se caractérise par une hyperréactivité allergique des voies respiratoires induite par des allergènes, une éosinophilie intense, une surproduction du mucus et une inflammation anormales des voies aériennes (Hamid and Tulic, 2009; Prado et *al.*, 2011; Roos et *al.*, 2014). Les déclencheurs génétiques et environnementaux modulant l'activation et la régulation du système immunitaire sont les principaux orchestrateurs de la physiopathologie de l'asthme (Athari, 2019).

Parmi les cellules qui participent dans l'inflammation des voies respiratoires, on cite les mastocytes, les macrophages, les éosinophiles et les lymphocytes (Barnes and Liew, 1995).

L'iNOS est surexprimé dans les cellules épithéliales et les macrophages du poumon après exposition à des cytokines inflammatoires (Lee et *al.*, 2017). Cela conduit à la production de grandes quantités de NO qui va jouer un rôle essentiel dans l'amplification de la réponse inflammatoire chez les patients asthmatiques. Cela entraîne une augmentation des symptômes et l'obstruction des voies respiratoires (Barnes, 1996).

1.3. Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

1.3.1. Définition

PCR ou réaction de polymérisation en chaîne (« *Polymerase Chain Reaction* ») est une des techniques de base révolutionnaires en biologie moléculaire, développée par le biochimiste Kary Mullis au début des années 1980 (Mullis and Faloona, 1987). C'est une méthode d'amplification des acides nucléiques *in vitro* (Ishmael and Stellato, 2008) qui consiste à amplifier une seule ou quelques copies d'un fragment d'ADN spécifique d'intérêt sur plusieurs ordres de grandeurs, générant ainsi des milliers à des millions de copies de ce segment d'ADN (Solanki, 2012).

C'est une technique rapide, peu couteuse et simple. Elle est devenue un outil essentiel et indispensable dans la recherche médicale et biologique (Solanki, 2012). Sa puissance est devenue évidente dans plusieurs domaines et applications : comme dans le diagnostic des maladies infectieuses, la détection des variations et mutations des gènes (Powledge, 2004), le diagnostic du cancer, la médecine légale (Ishmael and Stellato, 2008) et elle joue aussi un rôle essentiel dans l'étude de l'expression du gène.

L'expression du gène est un processus important pour développer diverses fonctions biologiques (Wang and Cheng, 2018). Elle porte des informations critiques sur les mécanismes de régulation (He et *al.*, 2019) qui dans une cellule ou un tissu déterminent leur structure et leur fonction (Sandvik et *al.*, 2006). L'étude de l'expression des gènes est importante pour comprendre leurs changements dans diverses conditions, y compris les processus physiopathologiques (Wang and Cheng, 2018).

A ce jour, Plusieurs variétés de techniques spécifiques basées sur la PCR ont été développées, on cite parmi elles : la PCR en temps réel (PCR quantitative, q-PCR) et la PCR à transcription inverse (RT-PCR) (Jalali et *al.*, 2017).

1.3.2. Principe de la PCR

La PCR part du principe que c'est une réaction en chaîne (Solanki, 2012) *in vitro* qui va imiter le processus *in vivo* de la réplication de l'ADN (Seemayer, 1990) qui a lieu à chaque division cellulaire (Waters and Shapter, 2014), c'est-à-dire qu'à chaque cycle de la réaction il y'aura une amplification exponentielle de l'ADN (Ahrberg et al., 2016).

1.3.3. Composants de la PCR

Une réaction de PCR nécessite 4 principaux composants et d'autres composants de base pour assurer sa fonctionnalité.

i. Un modèle d'ADN (DNA template)

L'ADN matrice, peut être sous forme simple ou double brin qui contient la séquence cible (Bhat and Rao, 2020; Jalali et al., 2017). La PCR peut amplifier un ADN de n'importe quel type de source, comme par exemple, à partir du sang périphérique, d'échantillons de tissus, de microorganismes ou bien même à partir de cheveux ou d'ongles (Powledge, 2004) et elle peut aussi amplifier des quantités d'ADN infimes (Seemayer, 1990).

ii. Des amorces

Les amorces sont une courte paire d'oligonucléotides, simple brin, sens et anti-sens (Ishmael and Stellato, 2008) d'environ 20 bases (Seemayer, 1990). Elles sont spécifiques et complémentaires aux extrémités de la séquence d'ADN cible d'intérêt et agissent comme un point de départ pour la synthèse du nouveau brin d'ADN (Shah, 2019).

iii. Des nucléotides

Les désoxy-nucléotides triphosphates (dNTP) sont les éléments constitutifs de l'ADN qui comptent quatre nucléotides libres, l'adénine triphosphate (ATP), la thymine triphosphate (TTP), la guanine triphosphate (GTP) et la cytosine triphosphate (CTP) (Waters and Shapter, 2014).

iv. Une enzyme

Une ADN polymérase qui grâce aux amorces et aux nucléotides permet de synthétiser de nouveaux brins d'ADN complémentaires de la séquence cible (Jalali et al., 2017).

L'ADN polymérase isolée d'*Escherichia coli* était inactivée de manière irréversible en présence de température élevée pour la dénaturation de l'ADN, ce qui oblige à ajouter une nouvelle enzyme fraîche à chaque cycle de la réaction et cela rend le processus coûteux et

très long (Seemayer, 1990). Cependant, ce processus a été nettement amélioré en substituant l'enzyme par une autre polymérase thermostable qui était la Taq polymérase isolée à partir de la bactérie *Thermus aquaticus* qui est une bactérie qui se développe dans les sources chaudes (Mullis, 1990). Cette polymérase est stable à des températures élevée ce qui a permis l'automatisation de la réaction (Powledge, 2004). A ce jour, Un large choix d'enzymes thermostables est disponible mais la Taq polymérase reste la plus couramment utilisée (Bhat and Rao, 2020).

- **Une solution tampon** qui contient du Mg²⁺ (Welch, 2012).
- **Un thermocycleur**

Un thermocycleur est un appareil thermique qui change rapidement la température selon les réglages où l'ensemble de la réaction se déroule (Shah, 2019).

1.3.4. Les étapes de la PCR

Il y'a trois étapes principales dans le processus de l'amplification par PCR : la dénaturation, l'hybridation et l'élongation (Solanki, 2012).

Dans un premier cas, tous les composants de la PCR doivent être ajoutés dans un tube PCR qui est ensuite placé dans le thermocycleur où la réaction va se dérouler (Bhat and Rao, 2020).

1.3.4.1. Etape 1 – la dénaturation

Dans cette étape, l'ADN double brin sera dénaturé en ADN simple brin (Garcia and Ma, 2005), suite à son exposition à une forte température, habituellement à 95°C qui est nécessaire pour rompre les liaisons d'hydrogènes entre les paires de bases. Le temps nécessaire pour la dénaturation dépend de la séquence d'ADN (Green and Sambrook, 2019). Dans le premier cycle la dénaturation peut prendre jusqu'à 5 min pour séparer complètement les deux brins d'ADN et ensuite elle sera stabiliser à 95°C pendant 30s-60s (Bhat and Rao, 2020).

1.3.4.2. Etape 2 – l'hybridation

Après la dénaturation, la température est réduite à 50°C-60°C pendant 30s-60s (Bhat and Rao, 2020; Garcia and Ma, 2005) pour permettre l'hybridation des deux amorces par appariement de bases complémentaires à l'ADN simple brin (Powledge, 2004; Waters and Shapter, 2014).

1.3.4.3. Etape 3 – l'élongation

Après l'hybridation des amorces, la température est augmentée à 72°C pendant 1 min qui est une température optimale pour que l'enzyme Taq polymérase puisse fonctionner

Chapitre 1. Revue de littérature

(Pasic et *al.*, 2014). Grâce aux amorces comme point de départ et l'ajout des désoxynucléotides libres l'enzyme va synthétiser le nouveau brin complémentaire d'ADN (Ishmael and Stellato, 2008).

Le résultat à la fin du premier cycle donne deux nouveaux doubles brins d'ADN et chacun est composé d'un des brins d'origine et d'un des nouveaux brins nouvellement synthétisés (Solanki, 2012).

Ce cycle est répété généralement 30 à 40 fois. Le produit résultant de chaque cycle appelé « l'amplicon » (Overbergh et *al.*, 2017) devient le modèle d'ADN du suivant, d'où la réaction en chaîne (Welch, 2012). A la fin de chaque cycle la quantité de l'ADN cible sera amplifiée de façon exponentielle environ 2^n , où n représente le nombre de cycles (Fig 1.7) (Garcia and Ma, 2005; Waters and Shapter, 2014).

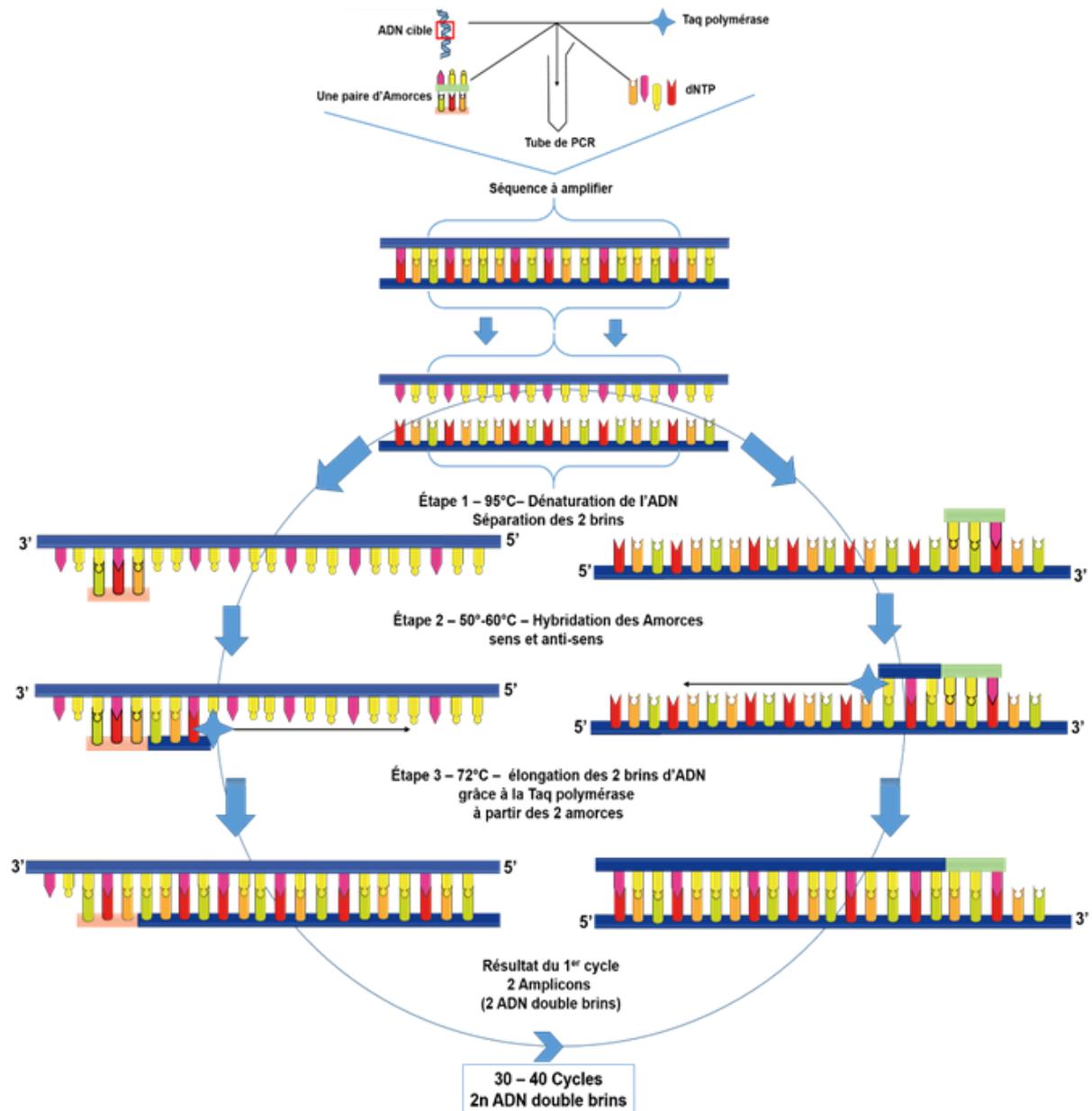


Figure 1.7. Représentation schématique de la réaction de polymérisation en chaîne (D'après Chuang et al., 2013). Le premier cycle de la PCR se compose de 3 étapes : Etape 1 – dénaturation de l'ADN, les deux brins d'ADN sont séparés par dénaturation thermique à 95°C. Etape 2 – hybridation des amorces, deux amorces sens et anti-sens s'hybrident à leurs séquences complémentaires des ADNsb, dans une température de 50 ° à 60°C. Etape 3 – élongation, l'enzyme Taq polymérase effectue la réaction de polymérisation en générant le nouveau brin complémentaire d'ADN, grâce aux amorces hybridées et l'ajout des nucléotides libres dans une température de 72°C. Le résultat après 1 cycle est de deux copies de la molécule d'ADN cible d'origine. Ensuite, ces 3 étapes sont répétées 30 à 40 fois pour amplifier le gène d'intérêt. ADN : Acide désoxyribonucléique, dNTP : Désoxy-nucléotides tri-phosphates, PCR : *Polymerase Chain Reaction*.

1.4. Choix des amorces de PCR

Une paire d'amorces sens et anti-sens est conçus pour la réaction de la PCR. Ces deux amorces sont des oligonucléotides courts simples brins et sont complémentaire et hautement spécifique aux extrémités 3' de chaque brin d'ADN qu'on veut amplifié (Pasic et *al.*, 2014; Bhat and Rao, 2020). Elles sont aussi nécessaires pour que l'ADN polymérase puisse s'y amorcer et synthétiser le nouveau brin d'ADN cible (Kumar and Chordia, 2015).

C'est pour cela que la spécificité et l'efficacité de l'amplification par PCR dépend principalement du choix de ces amorces (Welch, 2012).

1.4.1. Critères de choix de bonnes amorces

Il existe des paramètres qui doivent être pris en compte pour déterminer l'efficacité et la précision idéale des amorces :

- Une longueur des amorces optimale, d'environ 18 à 30 bases ;
- Une teneur en G-C d'amorce équilibrée, un rapport d'environ 40 à 60% (Welch, 2012) ;
- Une Température de fusion (T_m) similaire pour la formation d'un complexe amorce-matrice stable (Ozturk and Can, 2017) ;
- Vérification de la composition nucléotidique dans une extrémité 3' d'amorce (Chuang et *al.*, 2013) ;
- Eviter la formation des Structures secondaires, comme les auto-dimères, les épingles à cheveux et les dimères croisés (Chavali et *al.*, 2005).

1.4.2. Outils de conception des amorces

Les amorces conçues manuellement peuvent facilement donner des résultats incorrects, c'est pour cela qu'il est préférable de les concevoir par calcul automatique (Chuang et *al.*, 2013). De nos jours, de nombreux et divers outils et logiciels bio-informatiques qui facilite la bonne conception des amorces et détermine les propriétés des oligonucléotides ont été développés et sont disponible sur le web (Chavali et *al.*, 2005; Kumar and Chordia, 2015). Parmi eux on cite, Primer 3 (Whitehead Institute), Primer Express (Applied Biosystems), Primer-BLAST (NCBI) et Primer Premier (PREMIER Biosoft) (Elkins, 2015).

Le processus de conception d'amorces spécifique implique deux étapes. Premièrement, les amorces sont générées à l'aide de logiciels comme Primer3 et sont ensuite recherchées dans une base de données de séquences spécifiques à l'aide d'outils tels que BLAST pour examiner la spécificité de ces amorces (Ye et *al.*, 2012).

Un serveur Web géré par NCBI, appelé Primer-BLAST, facilite les deux opérations en combinant le Primer3 et le BLAST (Gervais et *al.*, 2010; NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).

1.5. Problématique et objectifs

1.5.1. Problématique

Les macrophages sont des cellules immunitaires mononucléaires phagocytaires et un élément clé du système immunitaire. Ils sont présents dans la plupart des tissus et des organes. Ils constituent la première ligne de défense contre les agents pathogènes et Ils sont aussi impliqués dans plusieurs maladies inflammatoires et auto-immunes.

L'iNOS est une enzyme catalytique oxydoréductase qui génère le NO à partir de l'acide aminé L-arginine. Cette enzyme est exprimée par les macrophages M1 en réponse à différents stimuli et est impliquée dans plusieurs conditions physiologiques et physiopathologiques.

La conception des amorces est une étape cruciale pour le succès de la réaction de la PCR, une technique qui permet l'amplification du gène d'intérêt afin d'étudier son expression dans les macrophages au cours de l'inflammation, l'auto-immunité, l'allergie respiratoire et l'immunité anti-infectieuse.

1.5.2. Objectif

Concevoir avec spécificité une paire d'amorce encadrant l'iNOS du gène *NOS2* exprimé par le macrophage M1 au cours de l'inflammation, l'auto-immunité, l'allergie respiratoire et l'immunité anti-infectieuse.

1.5.3. But

Etudier l'implication de l'iNOS dans l'inflammation et l'auto-immunité, l'allergie respiratoire et l'immunité anti-infectieuse en utilisant la PCR.

Chapitre 2. Matériels et méthodes

2.2. Conception des amorces pour le gène *NOS2*

2.2.1. Recherche de la séquence du gène *NOS2*

La conception des amorces encadrant le gène *NOS2* commence par la recherche de la séquence de référence du gène *NOS2*, dans une base de données de génomes. Dans notre travail, on a utilisé la base de données « Ensembl » (www.ensembl.org) (Fig 2.1, 2.2 et 2.3).

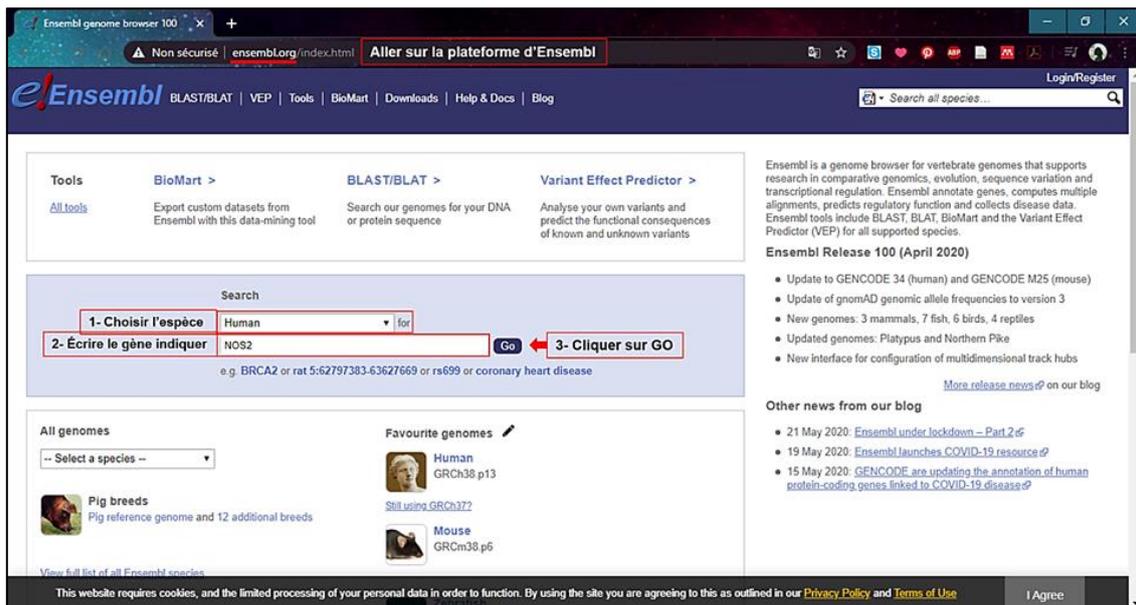


Figure 2.1. Plateforme de la base de données Ensembl. (1) Spécifier l'espèce Humaine puis (2) inscrire le nom du gène *NOS2* ensuite (3) cliquer sur GO pour afficher les résultats (encadrer en rouge).

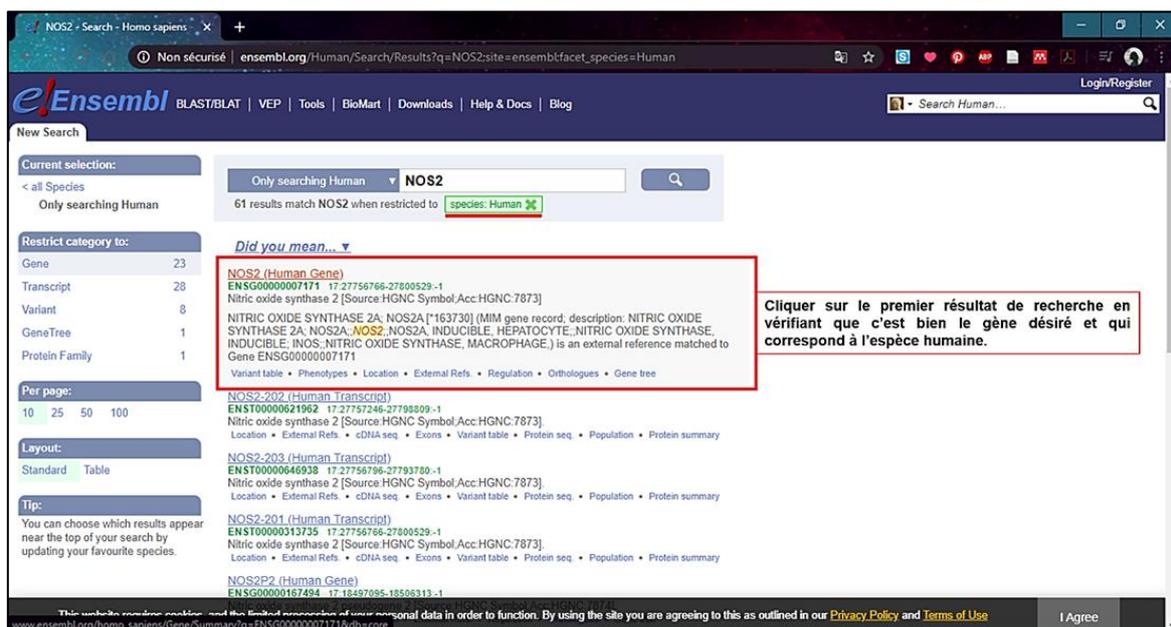


Figure 2.2. Résultats de la recherche du gène *NOS2*. Cliquer sur le premier résultat de recherche en vérifiant que c'est bien le gène désiré et qui correspond à l'espèce humaine (encadrer en rouge).

Chapitre 2. Matériels et méthodes

Gene: NOS2 (ENSG00000007171)

Description: nitric oxide synthase 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7873]

Gene Synonyms: HEP-NOS, NOS, NOS2A, INOS

Location: Chromosome 17: 27,756,766-27,800,529 reverse strand
GRCh38: CM000679.2

About this gene: This gene has 3 transcripts (splice variants), 222 orthologues, 5 paralogues, is a member of 1 Ensembl protein family and is associated with 2 phenotypes.

Name	Transcript ID	bp	Protein	Biotype	CCDS	UniProt	RefSeq Match	Flags
NOS2-201	ENST00000313735.11	4206	1153aa	Protein coding	CCDS11223.1	P35228	NM_006254.4	TSL1 GENCODE basic APPRIS P2 MANE Select v0.8
NOS2-203	ENST00000646938.1	3995	1152aa	Protein coding	-	A0A2R8YDS4	-	GENCODE basic APPRIS ALT2
NOS2-202	ENST0000021962.1	3345	1114aa	Protein coding	-	P35228	-	TSL1 GENCODE basic

Summary

Name: NOS2 (HGNC Symbol)

CCDS: This gene is a member of the Human CCDS set: CCDS11223.1

UniProtKB: This gene has proteins that correspond to the following UniProtKB identifiers: P35228

Figure 2.3. Caractéristiques du gène *NOS2*. La plateforme de la base de données montre les différentes caractéristiques du gène *NOS2*, ensuite il faut cliquer sur « Séquence » pour afficher la séquence du gène (encadrer en rouge).

La séquence du gène *NOS2* est présentée dans la figure 2.4.

Marked-up sequence

Download sequence | BLAST this sequence

Exons: NOS2 exons | All exons in this region

Markup: loaded

```
>chromosome:GRCh38:17:27756166:27801129:-1
AGTAGAACCACTCTCAGAGGCTCTCTGTGCAATAGCTTCTGCTTGGCTTCCCA
AAAACCTCAAGTACTTTCAGAGGCTCTCTGGAATAATGGCAATCATTAATACACT
GGCTCTGGACCTGGGCAATTTCCAGTGTCTTCACTGTCAATATCCCCAGCTT
CTGGCTCTCTGCAAGCTGGAAAGTGGAGAGTGGACAGGATTAACCAAGAGCT
CCCTCTGAGGAAATCTCCCAAGTCTGAAGTGGAGGCAATGTGGCTGGCCAAATA
AAACCTGGCTGGTGGCTCTATCTTAGCAGCCACTGCTGATGAACTGGCACTTG
GACTGGACCAAGAAAGGTTGGTTGGTGAAGGACACACAGAGTGAATACAG
CAGATCAGTCCACCAGGCTGGAGTCAAGTCAATAATTAAGTAACTGATACACA
ACTGGGACACTCCCTTGGAAACCAAAAGAAAGAAAGAAAGGACCTTATGCA
AAAACACTCTCGAGTGGATGGGAGATATAAATACTTCTGGCTGCCAGTGTCTT
ATAACTTGTAGGAGTGGAAACTGAGGCTCCGGCCGAGAACTGAGGCTATTCCCT
GCTTAAATCTCTCGGCACTTGGATGAGGAGCTGGCAGATTCAGACATCCCGAA
GTCTCAAGGACAGGCTCTCTCTGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCT
CCAGCTGGAGTGGTGGCTCTCTCTTCTGGGAGGCTGGCTGGGAGGCTGGCTGG
TCTTCTCTCTGGAGGCTGGAGGCTGGAGGCTGGAGGCTGGAGGCTGGAGGCTGG
GTTGGAAAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
TGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
CTGAAAGTCAAAATGGAGTTTGTATCTGCTAAGATTTTTTAAACAGAGATATCT
TATGCTCTTTAAGATTAAGCTCCCAAGTCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
CAATTTAGATGAATAAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
TAGAGTGGATCCAGGATTTGAACCAAGGCTTATGGGCTATAAGTCTTTCTTCT
TTCCTCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
CTGAGCTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGT
TTCAGTTTTTGTAGTCAAGTCTCTCTATGTTGCCAGGCTGAACTGGACTCTGGAC
TGAAGGATTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
```

Sélectionner une partie de la séquence et la collée sur un fichier Word.

Figure 2.4. La séquence du gène *NOS2* depuis la plateforme « Ensembl ». Il faut sélectionner une partie de la séquence et la copier sur un document Word. Les séquences codantes (27 Exons) sont représentées en rouge et les séquences non codantes (Introns) sont représentées en noir.

Chapitre 2. Matériels et méthodes

Pour faciliter la recherche des amorces, il faut sélectionner une partie avant l'exon et une partie après l'exon et ensuite encadrer la région d'intérêt (Fig 2.5).

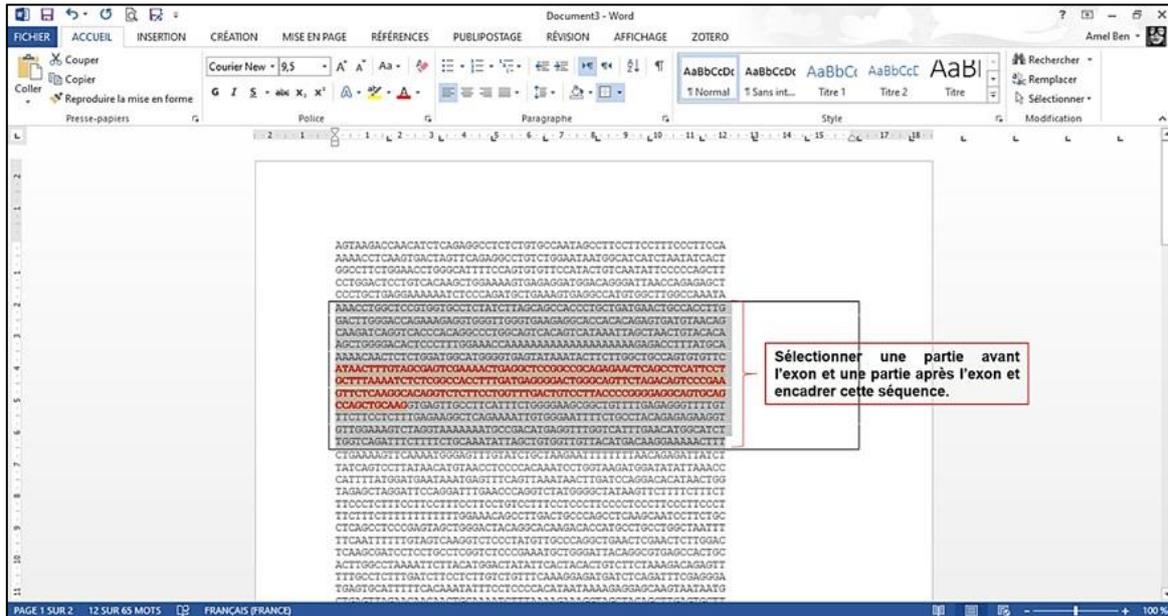


Figure 2.5. La séquence d'intérêt.

2.2.2. Le design des Primers : outil Primer-Blast

Afin de concevoir des amorces spécifiques de la séquence d'intérêt du gène *NOS2* qu'on veut amplifier, nous avons utilisé l'outil Primer-BLAST (Figure 2.6). Cet outil se trouve dans la base de données « National Center for Biotechnology Information (NCBI) » (www.ncbi.nlm.nih.gov). Les figures 2.6, 2.7 et 2.8 représentent les étapes à suivre pour l'utilisation de cet outil.

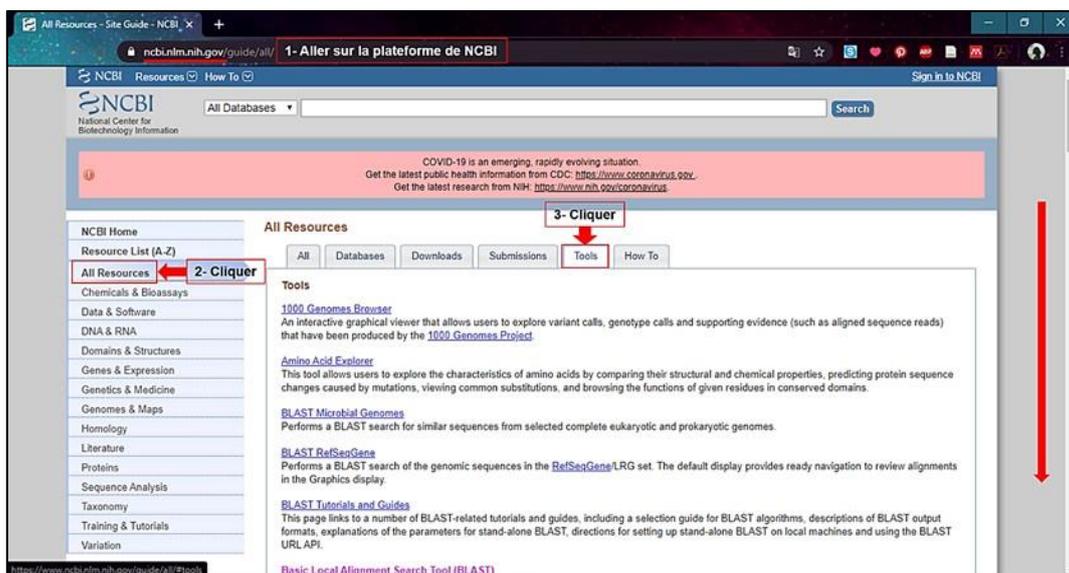


Figure 2.6. Plateforme de la base de données NCBI.

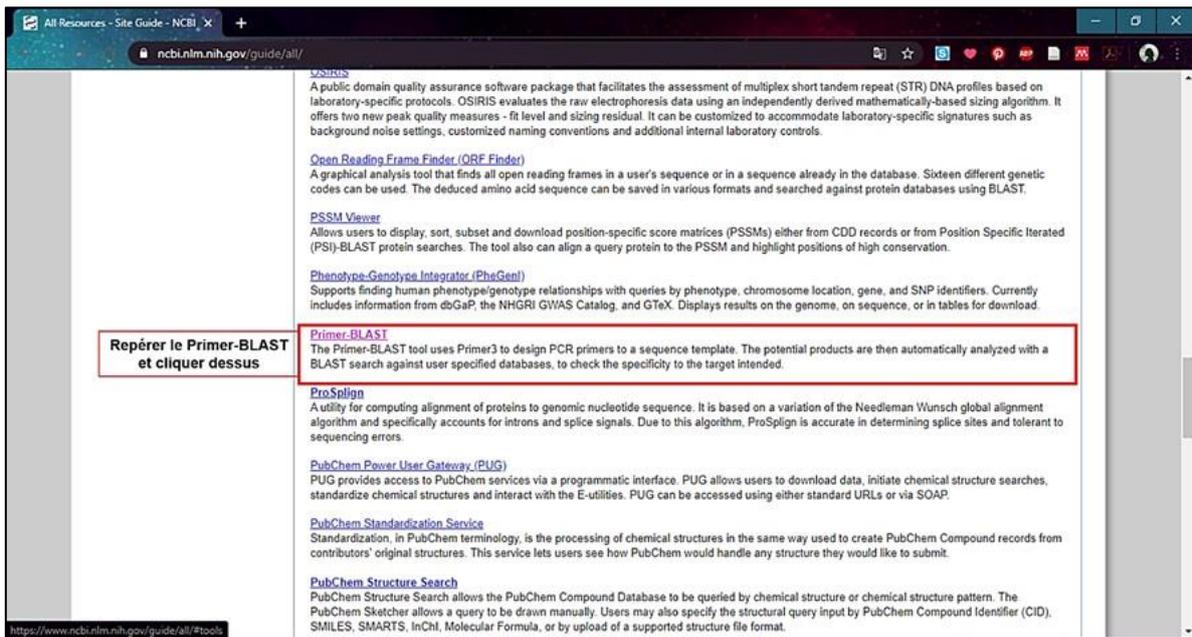


Figure 2.7. L'outil Primer-BLAST.

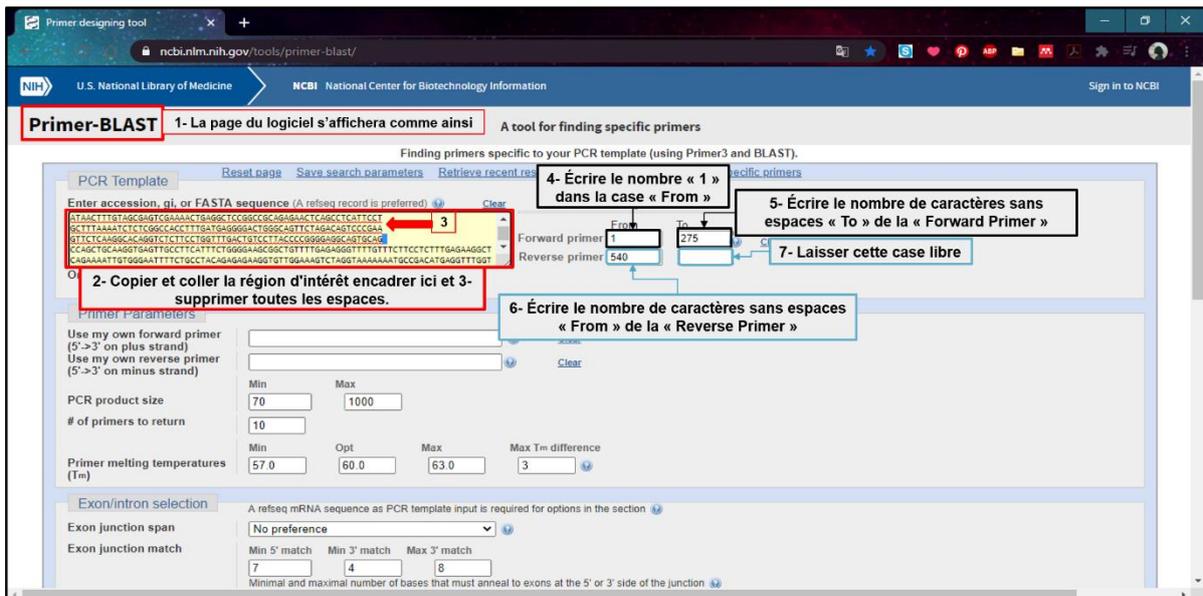


Figure 2.8. L'Outil Primer-BLAST. (1) La page du logiciel s'affichera comme dans la figure dessus, ensuite (2) copier la région d'intérêt encadrer du document Word et la coller dans la case « Enter accession, gi, or FASTA sequence » (encadrer en rouge), puis (3) supprimer les espaces entre les lignes (indiquer par la flèche rouge et l'espace en bleu), ensuite (4,5,6,7) on détermine les amorces sens et antisens (Forward et Reverse primers).

Chapitre 2. Matériels et méthodes

Afin d'optimiser les résultats, certains paramètres doivent être pris en considération lors de la conception des amorces (Fig 2.9).

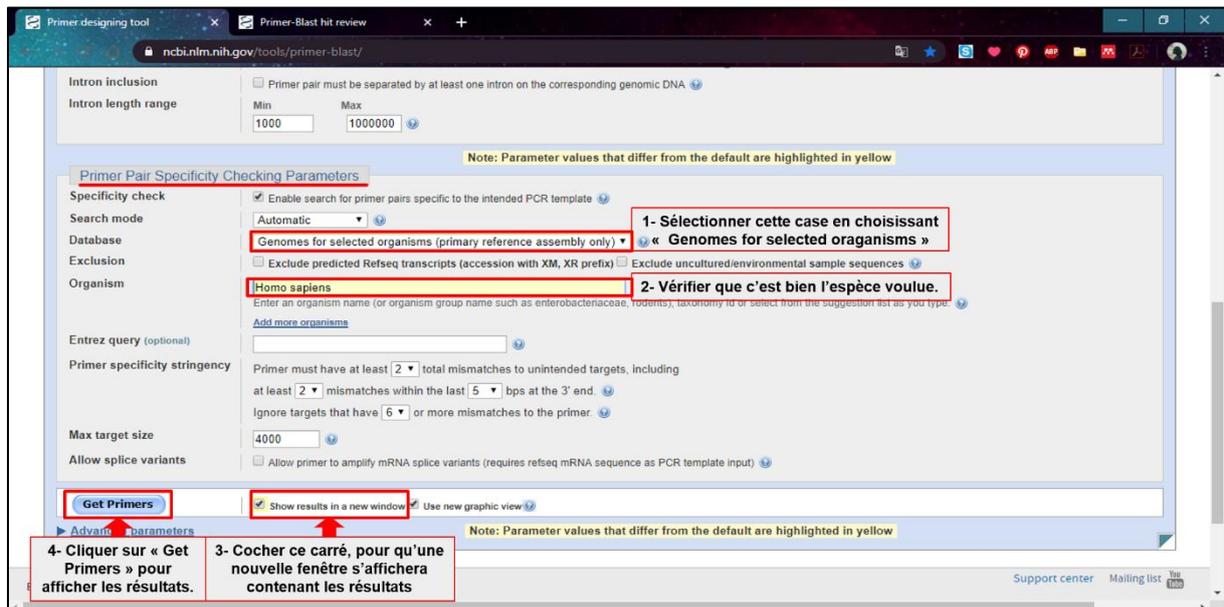


Figure 2.9. Primer Pair Specificity Checking Parameters. Faites défiler la page en bas, puis (1) sélectionner la case où c'est écrit « RefSeq mRNA » et choisir « Genomes for selected organisms », ensuite (2) vérifier l'espèce que c'est bien « Homo sapiens », puis (3) cocher la case « Show results in a new window » pour que les résultats s'afficheront dans une nouvelle fenêtre et après (4) cliquer sur « Get Primers » pour afficher les résultats.

2.2.3. Confirmation des résultats : *in-silico* PCR

Nous avons soumis les séquences des amorces choisies à une analyse de confirmation, afin de vérifier la fiabilité des amorces et ceci grâce à une réalisation d'une PCR *in silico* (PCR virtuelle) qui se fait par un programme dans la plateforme « UCSC genome browser » (genome.ucsc.edu.) (Fig 3.7).

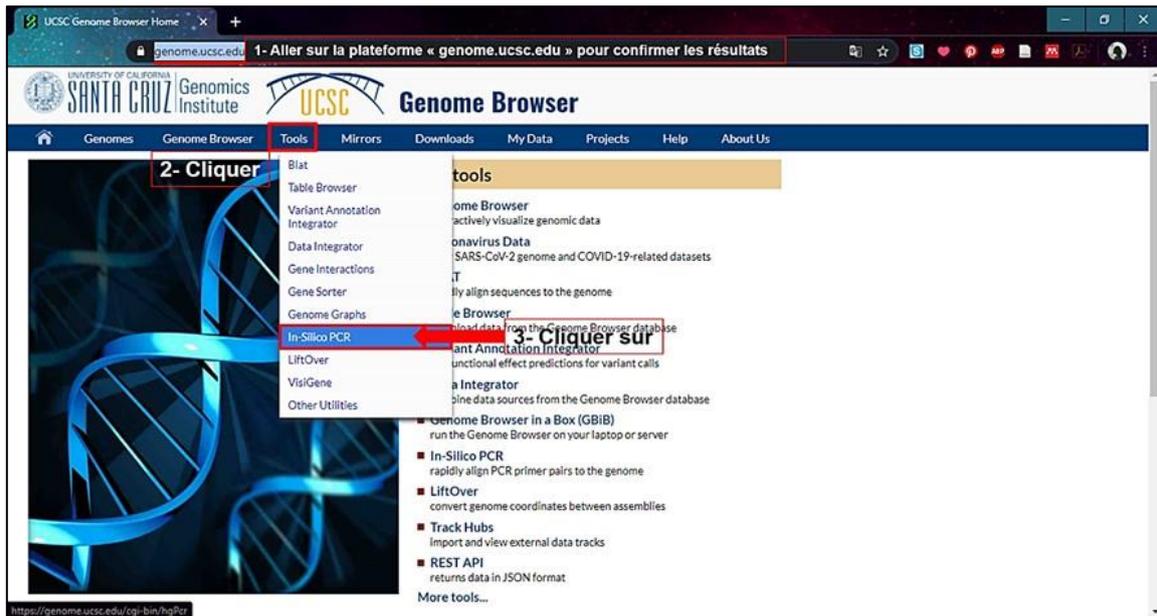


Figure 2.10. Confirmation des résultats par la plateforme « UCSC genome browser ». (1) Aller sur la plateforme « UCSC genome browser », puis (2) cliquer sur « Tools », ensuite (3) cliquer sur « *in-Silico PCR* ».

Chapitre 3. Résultats

3.1. Résultats de la conception des amorces

3.1.2. Résultats du Primer-BLAST

La conception des amorces spécifiques du gène *NOS2* a passé par plusieurs étapes. D'abord, le site Ensembl a été utilisé afin d'avoir l'intégrité du gène *NOS2*. Ce gène se compose de 27 exons. Dans cette étude, nous avons choisi l'exon 01. Ensuite, nous avons utilisé le programme Primer-blast sur la base de données NCBI. Cette dernière, nous a permis d'avoir 10 paires d'amorces propres au gène *NOS2* de l'exon 01.

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 3.1.

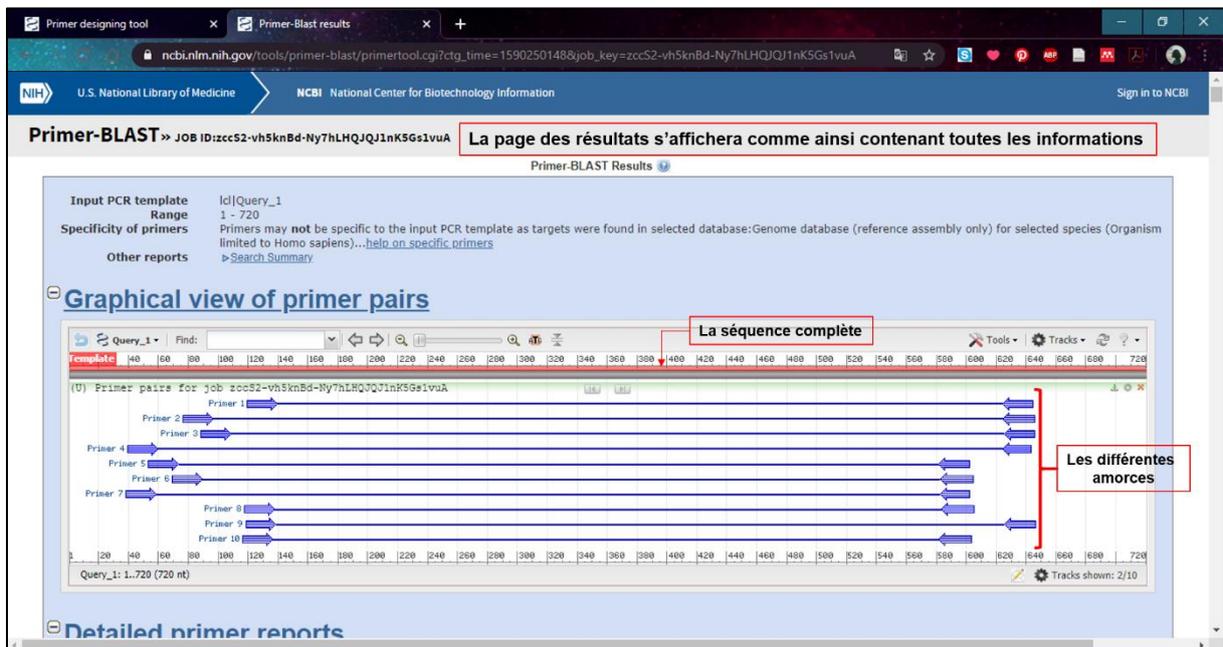


Figure 3.1. Les amorces. La page des résultats s'affiche comme en dessus, en rouge c'est la séquence complète et les flèches en bleu représentent les différentes amorces.

Dans un premier temps, les trois premiers couples d'amorces conçues par le logiciel Primer-BLAST, n'amplifieraient pas que la région voulue du gène. En effet, chaque couple d'amorces amplifierait en plus un produit aspécifique de moins de 900 Paires de bases (pb), donc ce résultat n'est pas pris en compte.

Chapitre 3. Résultats

Primer pair 4									
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TGCTGATGAAGTCCACCTT	Plus	20	40	59	59.89	50.00	3.00	1.00
Reverse primer	GACCAAACCTCATGTCCGC	Minus	19	643	625	58.83	57.89	4.00	2.00
Product length	604								

Figure 3.3. Primer pair 4.

Primer pair 9									
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AGCAAGATCAGGTCACCCAC	Plus	20	119	138	59.67	55.00	5.00	0.00
Reverse primer	AATGACCAAACCTCATGTCCG	Minus	21	646	626	58.56	47.62	4.00	2.00
Product length	528								

Figure 3.4. Primer pair 9.

Nous avons choisi la quatrième paire d'amorces « Primer pair 4 » et ceci pour les raisons suivantes (Fig 3.5) :

- Il n'y a qu'un seul produit de 604pb, donc les amorces sont bien spécifiques et elles contiennent moins de produits aspécifiques et aussi les 2 produits aspécifiques qu'ils y'a ont une longueur de >3000 sachant que la PCR n'amplifie pas des produits au-delà de 1000 Pb.
- La température d'hybridation (Tm) des amorces est d'environ 60°C.
- Les longueurs des amorces sont de 20 et 19 nucléotides pour l'amorce sens et anti sens, respectivement.
- Et enfin, la teneur en GC est de 50.00% et 57.89% pour l'amorce sens et anti sens respectivement. La teneur en GC d'une amorce doit être comprise entre 40 et 60%.

Chapitre 3. Résultats

Primer pair 4

	Sequence (5'>3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TGCTGATGAAGTGCACCTT	Plus	20	40	59	59.89	50.00	3.00	1.00
Reverse primer	GACCAAACCTCATGTCGGC	Minus	19	643	625	58.83	57.89	4.00	2.00
Product length	604								

1- Vérifier la longueur des amorces, leurs température de fusion, et leur teneur en GC%.

2- S'assurer que c'est bien l'espèce et le chromosome du gène voulu

3- Vérifier la longueur du produit « Spécifique » ; il ne doit pas dépasser une longueur de 1000 pb

4- S'assurer que tous les produits « Aspécifiques » ont une longueur de >1000 pour éviter que la PCR n'amplifier d'autre produit

Figure 3.5. Résultat du Primer-BLAST. (1) il faut vérifier la longueur des amorces, leurs températures d'hybridation et le rapport GC%, ensuite (2) il faut vérifier que c'est bien l'espèce et le chromosome du gène voulu, puis (3) vérifier la longueur du produit spécifique < 1000pb et (4) s'assurer que tous les produits aspécifiques ont une longueur de > 1000pb.

Nous avons ensuite situé, notre paire d'amorces dans la séquence du gène *NOS2* (Fig 3.6).

```

AGTAAGACCAACATCTCAGAGGCCTCTCTGTGCCAATAGCCTTCCTTCCTTTCCCTTCCA
AAAACCTCAAGTGACTAGTTCAGAGGCCTGTCTGGAATAATGGCATCATCTAATATCACT
GGCCTCTGGAACTGGGCATTTCCAGTGTGTTCCATACTGTCAATATCCCCAGCTT
CCTGGACTCCTGTCCAAAGCTGGAAAAGTGAGAGGATGGACAGGGATTAACCAGAGAGCT
CCCTGCTGAGGAAAAATCTCCAGATGCTGAAAGTGAGGCCATGTGGCTTGGCCAAATA
AAACCTGGCTCCGTGGTGCCTCTATCTTAGCAGCCACCTTGCTGATGAAGTGCACCTT
GACTTGGGACCCAGAAAGAGTGGGTTGGGTGAAGAGGCCACACAGAGTGATGTAACAG
CAAGATCAGGTCACCCACAGGCCCTGGCAGTCACAGTCATAAATTAGCTAACTGTACACA
AGCTGGGGACACTCCCTTTGGAAACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAGACCTTTATGCA
AAAACAACCTCTCTGGATGGCATGGGGTGGTATAAATACTTCTTGGCTGCCAGTGTGTT
ATAACTTTGTAGCGAGTCCGAAACTGAGGCTCCGGCCGAGAGAACTCAGCCTCATTCCT
GCTTTAAAAATCTCCTGGCCACCTTTGATGAGGGGAGTGGGCAGTTCTAGACAGTCCCGAA
GTTCTCAAGGACAGGTCCTTCTGGTGGTACTGTCCTTACCCGGGGAGGCGAGTGCAG
CCAGCTGCAAGGTGAGTTGCCCTCATTTCTGGGAAGCGGCTGTTTTGAGAGGGTTTGT
TTCTTCTCTTTGAGAAGGCTCAGAAAATTTGGGAATTTCTGCTACAGAGAGAAGGT
GTTGGAAAGTCTAGGTAAAAAATGCCGACATGAGGTTTGGTTCATTGGAACATGGCATCT
TGGTGAGATTTCTTTCTGCAAATATTAGCTGTGGTGTACATGACAAGGAAAACTTT
CTGAAAGTTCAAATGGGAGTTTGTATCTGCTAAGAATTTTTTTAACAGAGATTATCT
TATCAGTCCTTTATAACATGTAACCTCCCAAAATCCTGGTAAGATGGATATATTAAC
CATTTTATGGATGAATAAATGAGTTTCAGTTAAATAACTTGATCCAGGACACATAACTGG
TAGAGCTAGGATTCAGGATTTGAACCCAGGTCATGGGGCTATAAGTTCTTTCTTCT
TTCCCTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT
    
```

Intron 1

Forward primer

Exon 1

Reverse primer

Intron 2

Figure 3.6. Les amorces encadrant la région d'intérêt. La Paire d'amorces N°4 (en jaune) encadrant la partie de la séquence de l'ADN qu'on veut amplifier du gène *NOS2*; Forward Primer (amorces sens) (TGCTGATGAAGTGCACCTT), Reverse Primer (amorces anti-sens) (AATGACCAAACCTCATGTCGG).

Chapitre 3. Résultats

3.1.2. Résultats de la confirmation par *In-silico* PCR

Les résultats obtenus nous ont confirmés la taille du produit spécifique obtenus 604pb ainsi que la spécificité des amorces conçues, les informations obtenues confirment aussi le chromosome 17 porteur du gène *NOS2*, la séquence des amorces et la température d'hybridation (Fig 3.7). Donc, ce résultat nous confirme la fiabilité des amorces que nous avons choisies.

UCSC In-Silico PCR

Forward primer

chr17:2780187-27802790 604bp TCTGATGAAGTCCACCTT GACCAAACTCATGTCGGC

TCTGATGAAGTCCACCTTggacttggacacagaaagatgggtggg
tgaagaggcaccacacagatgatgaacagcaagatcaggtcaccaca
ggccttggcagtcacagtcataaattagctaacgtacacaagctggga
cactccttggaaaccccccccccccccccccccccccccccccccttatgc
aaaaaacactctctggatggcctggggtagtataaactctctggctg
ccagtggttcataacctttagcagtcgaaactgaggtccggcgc
agaagactcagcctcattctctttaaattctcggccaccttgatg
ggggaactggcagttctagacagctccgaagtctcaaggcacaggtct
cttctggttgaactgtcttaccggggagcagtcacagcagctca
agtgagttgcttcatttctggggaagcggctgtttgagaagggtttg
tttcttctcttggagaagctcagaaaaattgggaatttctgcctac
aggaagaagggttggaaagcttagtataaaaaaGCGACATGAAGTTT
GGTC

Vérifier que c'est bien le chromosome porteur du gène ainsi que la longueur du produit spécifique.

L'inverse de la Reverse primer et sa complémentaire

Primer Melting Temperatures

Forward: 61.8 C tctgatgaactgccacctt
Reverse: 61.5 C gaccaaactcatgtcggc
The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration. The code to calculate the melting temp comes from [Primer3](#).

Help

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

Figure 3.7. Résultats de la confirmation. Un seul résultat est affiché comme en dessus, vérifier si la taille et le chromosome sont les même que ceux de notre gène.

Chapitre 4. Conclusions et perspectives

Chapitre 4. Conclusions et perspectives

Les macrophages se caractérisent par une forte plasticité d'où leur rôle anti-inflammatoire et pro-inflammatoire. Les macrophages M1 ont une capacité à induire des réponses et des marqueurs inflammatoires dont l'iNOS. Ce marqueur est associé à la réaction inflammatoire qui suit une infection, une maladie ou un dommage tissulaire.

Compte tenu du rôle prépondérant que joue l'iNOS dans le processus inflammatoire, il s'avère important d'étudier l'expression de son gène dans divers processus physiopathologiques. Cela consiste à élaborer des amorces spécifiques qui encadrent une séquence d'ADN d'intérêt, ceci est une étape cruciale dans la réussite de la réalisation d'une réaction de polymérisation en chaîne.

Au cours de ce travail, on a pu accéder à la séquence génomique du gène *NOS2* et ainsi on a pu concevoir avec spécificité un couple d'amorce encadrant une région d'intérêt au niveau de l'exon 01 du gène *NOS2*. Cela servira à amplifier le gène en utilisant la PCR.

On a eu comme résultats à l'aide de l'outil Primer-BLAST un couple d'amorces bien spécifique nécessaire à l'amplification de l'exon 01, la séquence de l'amorce sens (Forward primer) : 5' TGCTGATGAACTGCCACCTT 3' et la séquence de l'amorce anti-sens (Reverse primer) : 5' AATGACCAAACCTCATGTCGG 3'.

En termes de perspectives, les amorces conçues dans cette étude sont indispensables pour toute étude de recherche ultérieure concernant l'expression du gène *NOS2* afin de détecter la présence ou l'absence des mutations ou observer les variations génétiques au niveau de ce gène et aussi ses différentes fonctions dans de nombreuses pathologies.

Ce travail m'a permis de me familiariser avec les différents outils du domaine bio-informatique tels que la recherche de séquence génomique dans les bases de données, l'élaboration d'amorces spécifiques grâce aux logiciels informatiques et ainsi connaître les caractéristiques fondamentales au bon choix d'amorces pour le bon déroulement d'une PCR.

Chapitre 5. Bibliographie

A

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S., and Baker, D.L. (2015). Cellular and molecular immunology (Philadelphia, Pa: Elsevier, Saunders).

Ahrberg, C.D., Manz, A., and Chung, B.G. (2016). Polymerase chain reaction in microfluidic devices. *Lab Chip* 16, 3866–3884.

Aktan, F. (2004). iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sciences* 75, 639–653.

Alikhan, M.A., and Ricardo, S.D. (2013). Mononuclear phagocyte system in kidney disease and repair: Renal mononuclear phagocyte system. *Nephrology* 18, 81–91.

Anaya, J.-M. (2010). The autoimmune tautology. *Arthritis Res Ther* 12, 147, ar3175.

Arnhold, S., When, M., Labb, D., Andressen, C., and Addicks, K. (2004). Transient expression of NOS-II during development of the murine enteric nervous system. *J Mol Hist* 35, 741–748.

Athari, S.S. (2019). Targeting cell signaling in allergic asthma. *Sig Transduct Target Ther* 4, 45.

B

Banerjee, S., Cui, H., Xie, N., Tan, Z., Yang, S., Icyuz, M., Thannickal, V.J., Abraham, E., and Liu, G. (2013). miR-125a-5p Regulates Differential Activation of Macrophages and Inflammation. *J. Biol. Chem.* 288, 35428–35436.

Baranipour, S., Amini Kadijani, A., Qujeq, D., Shahrokh, S., Haghazali, M., Mirzaei, A., and Asadzadeh-Aghdaei, H. (2018). Inducible nitric oxide synthase as a potential blood-based biomarker in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 11, S124–S128.

Barnes, P.J. (1996). NO or no NO in asthma? *Thorax* 51, 218–220.

Barnes, P.J., and Liew, F.Y. (1995). Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunology Today* 16, 128–130.

Baydoun, H.H., Cherian, M.A., Green, P., and Ratner, L. (2015). Inducible nitric oxide synthase mediates DNA double strand breaks in Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-induced leukemia/lymphoma. *Retrovirology* 12, 71.

Bhat, A.I., and Rao, G.P. (2020). Polymerase Chain Reaction. In *Characterization of Plant Viruses*, (New York, NY: Springer US), pp. 323–345.

Billiau, A., and Matthys, P. (2009). Interferon- γ : A historical perspective. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 20, 97–113.

Bogdan, C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2, 907–916.

Bogdan, C. (2015). Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends in Immunology* 36, 161–178.

C

Cassetta, L., Cassol, E., and Poli, G. (2011). Macrophage Polarization in Health and Disease. *The Scientific World JOURNAL* 11, 2391–2402.

Chakravorty, D., and Hensel, M. (2003). Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. *Microbes and Infection* 5, 621–627.

Chavali, S., Mahajan, A., Tabassum, R., Maiti, S., and Bharadwaj, D. (2005). Oligonucleotide properties determination and primer designing: a critical examination of predictions. *Bioinformatics* 21, 3918–3925.

Chávez-Galán, L., Olleros, M.L., Vesin, D., and Garcia, I. (2015). Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169+ and TCR+ Macrophages. *Front. Immunol.* 6.

Chuang, L.-Y., Cheng, Y.-H., and Yang, C.-H. (2013). Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnol Lett* 35, 1541–1549.

Cinelli, M.A., Do, H.T., Miley, G.P., and Silverman, R.B. (2020). Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Med Res Rev* 40, 158–189.

Covarrubias, A., Byles, V., and Horng, T. (2013). ROS sets the stage for macrophage differentiation. *Cell Res* 23, 984–985.

D

Dai, R., Phillips, R.A., Karpuzoglu, E., Khan, D., and Ahmed, S.A. (2009). Estrogen Regulates Transcription Factors STAT-1 and NF- κ B to Promote Inducible Nitric Oxide Synthase and Inflammatory Responses. *J Immunol* 183, 6998–7005.

Davies, L.C., Jenkins, S.J., Allen, J.E., and Taylor, P.R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol* 14, 986–995.

Dey, A., Allen, J., and Hankey-Giblin, P.A. (2015). Ontogeny and Polarization of Macrophages in Inflammation: Blood Monocytes Versus Tissue Macrophages. *Front. Immunol.* 5.

Di Benedetto, P., Ruscitti, P., Vadasz, Z., Toubi, E., and Giacomelli, R. (2019). Macrophages with regulatory functions, a possible new therapeutic perspective in autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews* 18, 102369.

Dunster, J.L. (2016). The macrophage and its role in inflammation and tissue repair: mathematical and systems biology approaches: Macrophage and its role in inflammation and tissue repair. *WIREs Syst Biol Med* 8, 87–99.

E

Edholm, E.-S., Rhoo, K.H., and Robert, J. (2017). Evolutionary Aspects of Macrophages Polarization. In *Macrophages*, M. Kloc, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 3–22.

Elkins, K.M. (2015). Primer Design for PCR Reactions in Forensic Biology. In *PCR Primer Design*, C. Basu, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 17–30.

Espinoza-Jiménez, A., Peón, A.N., and Terrazas, L.I. (2012). Alternatively Activated Macrophages in Types 1 and 2 Diabetes. *Mediators of Inflammation* 2012, 1–10.

F

Fakhoury, M., Al-Salami, H., Negrulj, R., and Mooranian, A. (2014). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments. *JIR* 113.

Forstermann, U., and Sessa, W.C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal* 33, 829–837.

G

Galván-Peña, S., and O'Neill, L.A.J. (2014). Metabolic Reprograming in Macrophage Polarization. *Front. Immunol.* 5.

Garcia, J.G.N., and Ma, S.-F. (2005). Polymerase chain reaction: A landmark in the history of gene technology: *Critical Care Medicine* 33, S429–S432.

Gervais, A.L., Marques, M., and Gaudreau, L. (2010). PCRTiler: automated design of tiled and specific PCR primer pairs. *Nucleic Acids Research* 38, W308–W312.

Gordon, S., Plüddemann, A., and Martinez Estrada, F. (2014). Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunol Rev* 262, 36–55.

Green, M.R., and Sambrook, J. (2019). Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb Protoc* 2019, pdb.top095109.

Guo, Z., and Geller, D.A. (2014). microRNA and Human Inducible Nitric Oxide Synthase. In *Vitamins & Hormones*, (Elsevier), pp. 19–27.

H

Hamid, Q., and Tulic, M. (2009). Immunobiology of Asthma. *Annu. Rev. Physiol.* 71, 489–507.

He, L., Binari, R., Huang, J., Falo-Sanjuan, J., and Perrimon, N. (2019). In vivo study of gene expression with an enhanced dual-color fluorescent transcriptional timer. *ELife* 8, e46181.

I

Iijima, H., Tulic, M.K., Duguet, A., Shan, J., Carbonara, P., Hamid, Q., and Eidelman, D.H. (2005). NOS 1 Is Required for Allergen-Induced Expression of NOS 2 in Mice. *Int Arch Allergy Immunol* 138, 40–50.

Ishmael, F.T., and Stellato, C. (2008). Principles and applications of polymerase chain reaction: basic science for the practicing physician. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 101, 437–443.

J

Jaffrey, S.R., and Snyder, S.H. (1995). Nitric Oxide: A Neural Messenger. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 417–440.

Jaitovich, A., and Jourd'heuil, D. (2017). A Brief Overview of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species Signaling in Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. In *Pulmonary Vasculature Redox Signaling in Health and Disease*, Y.-X. Wang, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 71–81.

Jalali, M., Zaborowska, J., and Jalali, M. (2017). The Polymerase Chain Reaction. In *Basic Science Methods for Clinical Researchers*, (Elsevier), pp. 1–18.

Jiao, J., Wu, J., Huang, D., and Liu, L. (2015). Lack of association of the iNOS gene polymorphism with risk of cancer: a systematic review and Meta-Analysis. *Sci Rep* 5, 9889.

Juhas, U., Ryba-Stanisławowska, M., Szargiej, P., and Myśliwska, J. (2015). Different pathways of macrophage activation and polarization. *Postepy Hig Med Dosw* 7.

K

Khan, A., Singh, V.K., Hunter, R.L., and Jagannath, C. (2019). Macrophage heterogeneity and plasticity in tuberculosis. *J Leukoc Biol* 106, 275–282.

Kielbik, Szulc-Kielbik, and Klink (2019). The Potential Role of iNOS in Ovarian Cancer Progression and Chemoresistance. *IJMS* 20, 1751.

Korhonen, R., Lahti, A., Kankaanranta, H., and Moilanen, E. (2005). Nitric Oxide Production and Signaling in Inflammation. *CDTIA* 4, 471–479.

Kovacevic, Z., Sahni, S., Lok, H., Davies, M.J., Wink, D.A., and Richardson, D.R. (2017). Regulation and control of nitric oxide (NO) in macrophages: Protecting the “professional killer cell” from its own cytotoxic arsenal via MRP1 and GSTP1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1861, 995–999.

Kröncke, K.-D., Fehsei, K., and Kolb-Bachofen, V. (1995). Review. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 376, 327–356.

Kumar, A., and Chordia, N. (2015). In Silico PCR Primer Designing and Validation. In *PCR Primer Design*, C. Basu, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 143–151.

Kumar, S., Jyoti, A., Keshari, R. shankar, Singh, M., Barthwal, M.K., and Dikshit, M. (2010). Functional and molecular characterization of NOS isoforms in rat neutrophil precursor cells. *Cytometry* 9999A, NA-NA.

L

Lechner, M., Lirk, P., and Rieder, J. (2005). Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: The two sides of the same coin. *Seminars in Cancer Biology* 15, 277–289.

Lee, M., Rey, K., Besler, K., Wang, C., and Choy, J. (2017). Immunobiology of Nitric Oxide and Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase. In *Macrophages*, M. Kloc, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 181–207.

Levesque, M., and Weinberg, J. (2004). The Dichotomous Role of Nitric Oxide in the Pathogenesis of Accelerated Atherosclerosis Associated with Systemic Lupus Erythematosus. *CMM* 4, 777–786.

Li, L., Zhu, L., Hao, B., Gao, W., Wang, Q., Li, K., Wang, M., Huang, M., Liu, Z., Yang, Q., et al. (2017). iNOS-derived nitric oxide promotes glycolysis by inducing pyruvate kinase M2 nuclear translocation in ovarian cancer. *Oncotarget* 8, 33047–33063.

Lind, M., Hayes, A., Caprnda, M., Petrovic, D., Rodrigo, L., Kruzliak, P., and Zulli, A. (2017). Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? *Biomedicine & Pharmacotherapy* 93, 370–375.

Chapitre 5. Bibliographie

Lirk, P., Hoffmann, G., and Rieder, J. (2002). Inducible Nitric Oxide Synthase - Time for Reappraisal. *CDTIA 1*, 89–108.

Liu, Y.-C., Zou, X.-B., Chai, Y.-F., and Yao, Y.-M. (2014). Macrophage Polarization in Inflammatory Diseases. *Int. J. Biol. Sci. 10*, 520–529.

Locati, M., Mantovani, A., and Sica, A. (2013). Macrophage Activation and Polarization as an Adaptive Component of Innate Immunity. In *Advances in Immunology*, (Elsevier), pp. 163–184.

Lu, G., Zhang, R., Geng, S., Peng, L., Jayaraman, P., Chen, C., Xu, F., Yang, J., Li, Q., Zheng, H., et al. (2015). Myeloid cell-derived inducible nitric oxide synthase suppresses M1 macrophage polarization. *Nat Commun 6*, 6676.

Lucinda, N., Figueiredo, M.M., Pessoa, N.L., Santos, B.S.Á. da S., Lima, G.K., Freitas, A.M., Machado, A.M.V., Kroon, E.G., Antonelli, L.R. do V., and Campos, M.A. (2017). Dendritic cells, macrophages, NK and CD8+ T lymphocytes play pivotal roles in controlling HSV-1 in the trigeminal ganglia by producing IL1-beta, iNOS and granzyme B. *Virology 14*, 37.

M

MacMicking, J., Xie, Q., and Nathan, C. (1997). NITRIC OXIDE AND MACROPHAGE FUNCTION. *Annu. Rev. Immunol. 15*, 323–350.

Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology 23*, 549–555.

Medzhitov, R. (2010). Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell 140*, 771–776.

Miljkovic, D., and Trajkovic, V. (2004). Inducible nitric oxide synthase activation by interleukin-17. *Cytokine & Growth Factor Reviews 15*, 21–32.

Minhas, R., Bansal, Y., and Bansal, G. (2020). Inducible nitric oxide synthase inhibitors: A comprehensive update. *Med Res Rev 40*, 823–855.

Mukherjee, C., Hale, C., and Mukhopadhyay, S. (2018). A Simple Multistep Protocol for Differentiating Human Induced Pluripotent Stem Cells into Functional Macrophages. In *Macrophages*, G. Rousselet, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 13–28.

Mullis, K.B. (1990). The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Sci Am 262*, 56–65.

Mullis, K.B., and Faloona, F.A. (1987). [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 335–350.

N

Negi, V.S., Mariaselvam, C.M., Misra, D.P., Muralidharan, N., Fortier, C., Charron, D., Krishnamoorthy, R., and Tamouza, R. (2017). Polymorphisms in the promoter region of *iNOS* predispose to rheumatoid arthritis in south Indian Tamils. *Int J Immunogenet 44*, 114–121.

O

Chapitre 5. Bibliographie

Orecchioni, M., Ghosheh, Y., Pramod, A.B., and Ley, K. (2019). Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Front. Immunol.* 10, 1084.

Overbergh, L., Vig, S., Coun, F., and Mathieu, C. (2017). Quantitative Polymerase Chain Reaction. In *Molecular Diagnostics*, (Elsevier), pp. 41–58.

Özenver, N., and Efferth, T. (2020). Small molecule inhibitors and stimulators of inducible nitric oxide synthase in cancer cells from natural origin (phytochemicals, marine compounds, antibiotics). *Biochemical Pharmacology* 113792.

Ozturk, A.R., and Can, T. (2017). A multiplex primer design algorithm for target amplification of continuous genomic regions. *BMC Bioinformatics* 18, 306.

P

Pan, L., Yang, S., Wang, J., Xu, M., Wang, S., and Yi, H. (2020). Inducible nitric oxide synthase and systemic lupus erythematosus: a systematic review and meta-analysis. *BMC Immunol* 21, 6.

Panaro, M.A., Brandonisio, O., Acquafredda, A., Sisto, M., and Mitolo, V. (2003). Evidences for iNOS Expression and Nitric Oxide Production in the Human Macrophages. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 3, 210–221.

Parisi, L., Gini, E., Baci, D., Tremolati, M., Fanuli, M., Bassani, B., Farronato, G., Bruno, A., and Mortara, L. (2018). Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases: Killers or Builders? *Journal of Immunology Research* 2018, 1–25.

Pasic, M., Hojilla, C., and Yousef, G.M. (2014). Polymerase Chain Reaction. In *Molecular Testing in Cancer*, G.M. Yousef, and S. Jothy, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 39–54.

Persichini, T., Mancino, G., Cappelli, G., Colizzi, V., and Lauro, G.M. (1997). Mycobacterium tuberculosis enhances iNOS mRNA expression and HIV replication in human astrocytoma cells: *NeuroReport* 8, 1897–1901.

Powledge, T.M. (2004). The polymerase chain reaction. *Advances in Physiology Education* 28, 44–50.

Prado, C.M., Martins, M.A., and Tibério, I.F.L.C. (2011). Nitric Oxide in Asthma Physiopathology. *ISRN Allergy* 2011, 1–13.

Q

Qidwai, T., and Jamal, F. (2010). Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) Gene Polymorphism and Disease Prevalence: Inducible Nitric Oxide Synthase. *Scandinavian Journal of Immunology* 72, 375–387.

Qu, Z., Li, W., and Fu, B. (2014). MicroRNAs in Autoimmune Diseases. *BioMed Research International* 2014, 1–8.

R

Rayner, F., and Isaacs, J.D. (2018). Therapeutic tolerance in autoimmune disease. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 48, 558–562.

Rhee, I. (2016). Diverse macrophages polarization in tumor microenvironment. *Arch. Pharm. Res.* 39, 1588–1596.

Roos, A.B., Mori, M., Grönneberg, R., Österlund, C., Claesson, H.-E., Wahlström, J., Grunewald, J., Eklund, A., Erjefält, J.S., Lundberg, J.O., et al. (2014). Elevated Exhaled Nitric Oxide in Allergen-Provoked Asthma Is Associated with Airway Epithelial iNOS. *PLoS ONE* 9, e90018.

Ruytinx, P., Proost, P., Van Damme, J., and Struyf, S. (2018). Chemokine-Induced Macrophage Polarization in Inflammatory Conditions. *Front. Immunol.* 9, 1930.

S

Saha, R.N., and Pahan, K. (2006). Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase Gene in Glial Cells. *Antioxidants & Redox Signaling* 8, 929–947.

Samavedi, S., Diaz-Rodriguez, P., Erndt-Marino, J.D., and Hahn, M.S. (2017). A Three-Dimensional Chondrocyte-Macrophage Coculture System to Probe Inflammation in Experimental Osteoarthritis. *Tissue Engineering Part A* 23, 101–114.

Sandvik, A.K., Alsberg, B.K., Nørsett, K.G., Yadetie, F., Waldum, H.L., and Lægreid, A. (2006). Gene expression analysis and clinical diagnosis. *Clinica Chimica Acta* 363, 157–164.

Schairer, D.O., Chouake, J.S., Nosanchuk, J.D., and Friedman, A.J. (2012). The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents. *Virulence* 3, 271–279.

Seemayer, T.A. (1990). Polymerase Chain Reaction. 7.

Shah, N.J. (2019). Polymerase Chain Reaction. In *Introduction to Basics of Pharmacology and Toxicology*, G.M. Raj, and R. Raveendran, eds. (Singapore: Springer Singapore), pp. 395–397.

Shahi, S., Zununi Vahed, S., Fathi, N., and Sharifi, S. (2018). Polymerase chain reaction (PCR)-based methods: Promising molecular tools in dentistry. *International Journal of Biological Macromolecules* 117, 983–992.

Shapiro, H., Lutaty, A., and Ariel, A. (2011). Macrophages, Meta-Inflammation, and Immuno-Metabolism. *The Scientific World JOURNAL* 11, 2509–2529.

Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S.-A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J.T., and Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol* 233, 6425–6440.

Shen, J., Lai, D.-H., Wilson, R.A., Chen, Y.-F., Wang, L.-F., Yu, Z.-L., Li, M.-Y., He, P., Hide, G., Sun, X., et al. (2017). Nitric oxide blocks the development of the human parasite *Schistosoma japonicum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 114, 10214–10219.

Smallwood, M.J., Nissim, A., Knight, A.R., Whiteman, M., Haigh, R., and Winyard, P.G. (2018). Oxidative stress in autoimmune rheumatic diseases. *Free Radical Biology and Medicine* 125, 3–14.

Solanki, G. (2012). POLYMERASE CHAIN REACTION. 2, 5.

Sonar, S.A., and Lal, G. (2019). The iNOS Activity During an Immune Response Controls the CNS Pathology in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Front. Immunol.* 10, 710.

Chapitre 5. Bibliographie

Soufli, I., Toumi, R., Raza, H., and Touil-Boukoffa, C. (2016). Overview of cytokines and nitric oxide involvement in immuno-pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *WJGPT* 7, 353.

Sousa, J.R. de, Vasconcelos, P.F. da costa, and Quaresma, J.A.S. (2019). Functional aspects, phenotypic heterogeneity, and tissue immune response of macrophages in infectious diseases. *IDR Volume 12*, 2589–2611.

Spekker-Bosker, K., Ufermann, C.-M., Oldenburg, M., Däubener, W., and Eller, S.K. (2019). Interplay between IDO1 and iNOS in human retinal pigment epithelial cells. *Med Microbiol Immunol* 208, 811–824.

Suschek, C., Schnorr, O., and Kolb-Bachofen, V. (2004). The Role of iNOS in Chronic Inflammatory Processes In Vivo: Is it Damage-Promoting, Protective, or Active at all? *CMM* 4, 763–775.

T

Takeuchi, O., and Akira, S. (2011). Epigenetic control of macrophage polarization. *Eur. J. Immunol.* 41, 2490–2493.

Tejero, J., and Stuehr, D. (2013). Tetrahydrobiopterin in nitric oxide synthase. *IUBMB Life* 65, 358–365.

Tiemessen, M.M., Jagger, A.L., Evans, H.G., van Herwijnen, M.J.C., John, S., and Taams, L.S. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 19446–19451.

V

Verdeguer, F., and Aouadi, M. (2017). Macrophage heterogeneity and energy metabolism. *Experimental Cell Research* 360, 35–40.

W

Wang, D., and Cheng, C. (2018). Genomics and Systems Biology. In *Cooperative and Graph Signal Processing*, (Elsevier), pp. 725–733.

Wang, L., Zhang, S., Wu, H., Rong, X., and Guo, J. (2019a). M2b macrophage polarization and its roles in diseases. *J Leukoc Biol* 106, 345–358.

Wang, N., Liang, H., and Zen, K. (2014a). Molecular mechanisms that influence the macrophage M1–M2 polarization balance. *Frontiers in Immunology* 10.

Wang, X.-F., Wang, H.-S., Zhang, F., Guo, Q., Wang, H., Wang, K.-F., Zhang, G., Bu, X., Cai, S.-H., and Du, J. (2014b). Nodal promotes the generation of M2-like macrophages and downregulates the expression of IL-12: Immunomodulation. *Eur. J. Immunol.* 44, 173–183.

Wang, Y., Smith, W., Hao, D., He, B., and Kong, L. (2019b). M1 and M2 macrophage polarization and potentially therapeutic naturally occurring compounds. *International Immunopharmacology* 70, 459–466.

Waters, D.L.E., and Shapter, F.M. (2014). The Polymerase Chain Reaction (PCR): General Methods. In *Cereal Genomics*, R.J. Henry, and A. Furtado, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 65–75.

Chapitre 5. Bibliographie

Weigert, A., and Brüne, B. (2008). Nitric oxide, apoptosis and macrophage polarization during tumor progression. *Nitric Oxide* 19, 95–102.

Weiss, G., and Schaible, U.E. (2015). Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol Rev* 264, 182–203.

Welch, H.M. (2012). The Polymerase Chain Reaction. In *Metastasis Research Protocols*, M. Dwek, S.A. Brooks, and U. Schumacher, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 71–88.

Wu, J., Xie, H., Yao, S., and Liang, Y. (2017). Macrophage and nerve interaction in endometriosis. *J Neuroinflammation* 14, 53.

Wynn, T.A., Chawla, A., and Pollard, J.W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496, 445–455.

X

Xu, W., Charles, I.G., Liu, L., Moncada, S., and Emson, P. (1996). Molecular Cloning and Structural Organization of the Human Inducible Nitric Oxide Synthase Gene (NOS2). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 219, 784–788.

Xue, Q., Yan, Y., Zhang, R., and Xiong, H. (2018). Regulation of iNOS on Immune Cells and Its Role in Diseases. *IJMS* 19, 3805.

Y

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

Yilmaz, A., Ilke, H., Alp, E., and Menevse, S. (2012). Real-Time PCR for Gene Expression Analysis. In *Polymerase Chain Reaction*, P. Hernandez-Rodriguez, ed. (InTech), p.

Yu, X., Ge, L., Niu, L., Lian, X., Ma, H., and Pang, L. (2018). The Dual Role of Inducible Nitric Oxide Synthase in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: Friend or Foe? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018, 1–7.

Z

Zamora, R., Vodovotz, Y., and Billiar, T.R. (2000). Inducible Nitric Oxide Synthase and Inflammatory Diseases. *Mol Med* 6, 347–373.

Résumé

Introduction : Les macrophages, cellules de l'immunité innée, sont impliqués dans les processus inflammatoires en produisant plusieurs médiateurs inflammatoires. Ces cellules expriment l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS ou NOS2), une enzyme qui permet la production du monoxyde d'azote (NO). Ce médiateur permet, d'une part, d'éliminer les infections par son effet microbicide, et d'autre part, de favoriser la progression des maladies auto-immunes et les allergies respiratoires.

Objectif : Concevoir une paire d'amorce encadrant une partie du gène NOS2 exprimé par le macrophage M1 au cours de l'inflammation, l'auto-immunité, l'allergie respiratoire et l'immunité anti-infectieuse.

Matériel et méthodes : La séquence du gène NOS2 a été obtenue grâce à la base de données « Ensembl ». Puis, les amorces ont été conçues à l'aide de l'outil « Primer-BLAST » du site NCBI.

Résultats : Un couple d'amorce spécifique qui présente des caractéristiques optimales pour le bon déroulement d'une PCR et qui donne un seul produit spécifique de 604 pb a été choisi.

Conclusion : En conclusion, les amorces obtenues peuvent être utilisées pour l'étude de l'expression du gène NOS2 dans diverses études ultérieures.

Mots clés : Amorces, Gène NOS2, Macrophage M1, PCR, Primer-BLAST.

Abstract

Introduction: Macrophages, cells of innate immunity, are involved in inflammatory processes by producing several inflammatory mediators. These cells express inducible nitric oxide synthase (iNOS or NOS2), an enzyme that enables the production of nitric oxide (NO). This mediator allows, on the one hand, to eliminate infections through its microbicidal effect, and on the other hand, to promote the progression of autoimmune diseases and respiratory allergies.

Objective: Design a primer pair flanking part of the NOS2 gene expressed by the M1 macrophage during inflammation, autoimmunity, respiratory allergy, and anti-infective immunity.

Materials and methods: The sequence of the NOS2 gene was obtained using the "Ensembl" database. Then, the primers were designed using "Primer-BLAST" software from the NCBI site.

Results: A pair of specific primers that exhibit optimal characteristics for the success of a PCR and which gives a single specific product of 604bp was chosen.

Conclusion: In conclusion, the primers obtained can be used for the study of the expression of the NOS2 gene in various subsequent studies.

Keywords: NOS2 Gene, Macrophage M1, PCR, Primers, Primer-BLAST.

ملخص

المقدمة: تشارك الخلايا البالعة، خلايا المناعة الطبيعية، في الالتهاب عن طريق إنتاج العديد من وسطاء الالتهاب. هذه الخلايا تعبر عن سينثاز أكسيد النيتريك المستحث (iNOS أو NOS2)، وهو إنزيم يتيح إنتاج أكسيد النيتريك (NO). يسمح هذا الوسيط، من ناحية، بالقضاء على الالتهابات من خلال تأثير مبيد الجراثيم، ومن ناحية أخرى، لتعزيز تطور أمراض المناعة الذاتية والحساسية التنفسية.

الهدف: تصميم زوج من البرايمرز يحيط بجزء من الجين NOS2 معبر عنه بواسطة الخلايا البالعة M1 أثناء الالتهاب، المناعة الذاتية، الحساسية التنفسية، والمناعة المضادة للعدوى.

المواد والطرق: تم الحصول على تسلسل الجين NOS2 من قاعدة بيانات «Ensembl»، ثم تم تصميم البرايمر باستخدام برنامج «Primer-BLAST».

النتائج: تم اختيار زوج من البرايمر المحددة التي تتمتع بخصائص مثالية لنجاح PCR وتعطي منتجًا واحدًا محددًا يبلغ 604pb.

الخلاصة: يمكن استخدام البادئات التي تم الحصول عليها لدراسة الجين NOS2 في دراسات لاحقة مختلفة.

كلمات البحث: الخلايا البالعة M1، البرايمر، الجين NOS2، Primer-BLAST، PCR.