



République Algérienne Démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique



UNIVERSITE DE TLEMCEEN - ABOU-BEKR BELKAID

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE, ET DES SCIENCES DE LA
TERRE ET D'UNIVERS

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

Laboratoire de biologie moléculaire appliquée et immunologie Biomolim

Mémoire

Présenté pour obtenir le grade de

DIPLOME DE MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité Immunologie

Par :

Ghizlane ATTAR

Soutenu le 08 Septembre 2020

Intitulé

**Conception des amorces du gène *IRF4* impliqué dans la régulation de la
différenciation des cellules Th9**

Jury:

President du jury: Dr. Chahrazed EL-MEZOUR

Examineur: Dr. Wafa NOUARI

Encadreur: Dr. Nabila BRAHAMI



République Algérienne Démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE DE TLEMCEEN - ABOU-BEKR BELKAID

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE, ET DES SCIENCES DE LA
TERRE ET D'UNIVERS

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

Laboratoire de biologie moléculaire appliquée et immunologie Biomolim

Mémoire

Présenté pour obtenir le grade de

DIPLOME DE MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité Immunologie

Par :

Ghizlane ATTAR

Soutenu le 08 Septembre 2020

Intitulé

**Conception des amorces du gène *IRF4* impliqué dans la régulation de la
différenciation des cellules Th9**

Jury:

President du jury: Dr. Chahrazed EL-MEZOUR

Examineur: Dr. Wafa NOUARI

Encadreur: Dr. Nabila BRAHAMI

Résumé

Les lymphocytes Th9 producteurs principalement d'IL-9 ont été découverts il y a plus d'une décennie et sont connus par leurs réponses anti-tumorale et leur protection contre les helminthes. À l'inverse, les cellules Th9 sont également impliquées dans la physiopathologie des maladies inflammatoires et auto-immunes. Les cellules T naïves nécessitent la combinaison de TGF- β et d'IL-4 pour devenir des cellules Th9, et son réseau transcriptionnel résulte d'un équilibre entre les voies de signalisation induites par les différentes cytokines nécessaires à sa polarisation qui implique la fonction coordonnée des facteurs de transcription clés y compris l'IRF4 le plus important pour la production de l'IL-9.

La continuité des études sur ce facteur et sur son gène exige une amplification par PCR, et ce travail présenté ici a permis la conception d'amorces spécifiques du gène *IRF4* via l'utilisation de l'outil de bio-informatique « NCBI ».

Au cours de cette étude nous avons pu obtenir la séquence complète génomique du gène *IRF4* grâce à la base de données Ensembl. Un couple d'amorces spécifique a été obtenu encadrant l'exon 2 du gène *IRF4* à l'aide du logiciel Primer-BLAST.

Ces amorces donneront, après amplification par PCR, un produit de 821 paires de bases exploitable pour des différentes analyses.

Mots clé : cellules Th9, IRF4, PCR, conception d'amorces.

Abstract

The predominantly IL-9 producing Th9 lymphocytes were discovered over a decade ago and are known for their anti-tumor responses and protection against helminths. Conversely, Th9 cells are also involved in the pathophysiology of inflammatory and autoimmune diseases. Naive T cells require the combination of TGF- β and IL-4 to become Th9 cells, and its transcriptional network results from a balance between the signaling pathways induced by the different cytokines necessary for its polarization which involves the function coordinate of key transcription factors including IRF4 most important for IL-9 production.

Continued studies of this factor and its gene require PCR amplification, and this work presented here has enabled the design of primers specific for the *IRF4* gene through the use of the "NCBI" bioinformatics tool.

During this study, we were able to obtain the complete genomic sequence of the *IRF4* gene using the Ensembl database. A specific pair of primers was obtained flanking exon 2 of the *IRF4* gene using the Primer-BLAST software.

These primers will give, after amplification by PCR, a product of 821 base pairs which can be used for various analyzes.

Keywords: Th9 cells, IRF4, PCR, primer design.

ملخص

تم اكتشاف الخلايا الليمفاوية التي تنتج في الغالب IL-9 منذ أكثر من عقد من الزمان وهي معروفة باستجاباتها المضادة للورم والحماية ضد الديدان الطفيلية. على العكس من ذلك ، تشارك خلايا Th9 أيضاً في الفيزيولوجيا المرضية للأمراض الالتهابية وأمراض المناعة الذاتية. تتطلب الخلايا التائية البسيطة الجمع بين $TGF-\beta$ و IL-4 لتصبح خلايا Th9 ، وتنتج شبكة النسخ الخاصة بها من التوازن بين مسارات الإشارات التي تحدثها السيتوكينات المختلفة اللازمة لاستقطابها الذي يتضمن الوظيفة تنسيق عوامل النسخ الرئيسية بما في ذلك IRF4 الأكثر أهمية لإنتاج IL-9.

تتطلب الدراسات المستمرة لهذا العامل وجينه تضخيم PCR ، وقد أتاح هذا العمل المقدم هنا تصميم البادئات الخاصة بجين *IRF4* من خلال استخدام أداة المعلوماتية الحيوية "NCBI".

خلال هذه الدراسة ، تمكنا من الحصول على التسلسل الجيني الكامل للجين *IRF4* بفضل قاعدة بيانات Ensembl. تم الحصول على زوج محدد من البادئات يحيط بـ 2 exon من جين *IRF4* باستخدام برنامج Primer-BLAST.

ستعطي هذه البادئات بعد التضخيم بواسطة PCR ، منتجاً من 821 زوجاً أساسياً يمكن استخدامه لتحليلات مختلفة.

الكلمات المفتاحية: خلايا Th9 ، IRF4 ، PCR ، تصميم البادئات.

Remerciement

Tout d'abord, je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à ma directrice de thèse Dr. Nabila BRAHAMI, pour son aide, son dynamisme et ses précieux conseils, et à mon professeur Mourad ARIBI. Je vous remercie pour votre accompagnement, mais aussi de m'avoir offert l'opportunité de découvrir et étudier cette magnifique spécialité.

Je souhaite également remercier tous les enseignants qui m'ont accompagné depuis le début de mon cursus universitaire, tout particulièrement le Professeur Dr Wafaa NOUARI pour son aide précieuse et sa bienveillance tout au long de mes années de Master.

Évidemment, je n'oublie pas ma collègue Djihane et tous mes camarades, leur aide et tous les merveilleux moments que nous avons partagés, tellement d'instant inoubliables vécus à leurs côtés.

Pour finir, je souhaite dédier mon travail à mes très chers parents, leur soutien moral m'a été très précieux durant toute ma scolarité. Mais également à mes frères Housseem et Aya ainsi qu'à l'ensemble des membres de ma famille, sans oublier mes amies et qui m'ont soutenu depuis le début, sans relâche.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
Abstract	iv
Résumé en Arabe	v
Remerciements	vi
Table des matières	vii
Liste des figures	x
Liste des tableaux	xi
Liste des abréviations	xii
Introduction	1
Chapitre 1. Revue de la littérature	
1.1. La cellule Th9	3
1.1.1. L'implication de Th9 en physiopathologie	4
1.1.1.1. Cancer	4
1.1.1.2. Maladies parasitaires	4
1.1.1.3. Asthme	4
1.1.1.4. Allergies cutanées	5
1.1.1.5. Maladies inflammatoires de l'intestin	5
1.1.1.6. Maladies auto-immunes	5
1.1.2. Signalisation	6
1.1.2.1. Différenciation	6
1.1.2.2. Régulation du développement	7
1.2. IRF4	10
1.2.1. Définition	10
1.2.2. IRF4, facteur majeur de la polarisation TH9	11
1.2.3. Structure	12
1.2.4. Gène IRF4	14
1.3. La technique de la réaction de polymérisation en chaîne	15
1.3.1. Définition	15
1.3.2. Principe	15

1.3.3. Acteurs	16
1.3.4. Étrapes	16
1.3.5. Choix d'amorce	17
1.3.5.1. Définition	17
1.3.5.2. Les outils	19
1.4. Problématique et objectifs	19
1.4.1. Problématique	19
1.4.2. Objectifs	20
1.4.3. But	20
Chapitre 2. Matériels et méthodes	
2.1. Conception d'amorces	22
2.2. Sélection d'amorces	22
2.2.1. La spécificité	22
2.2.2. La complémentarité	22
2.2.3. La longueur d'amorce	23
2.2.4. La température de fusion (T_m)	23
2.2.5. La teneur en GC	23
2.2.6. La séquence à l'extrémité 3'	23
2.3. La séquence du gène IRF4	23
2.4. Le design de primer	24
2.5. Les conditions de choix de la bonne amorce	25
Chapitre 3. Résultats	
3.1. Résultats de la conception d'amorces	27
3.2. Interprétation des résultats	28

3.3. Confirmation des résultats

28

Chapitre 4. Conclusion

Chapitre 5. Bibliographie

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Effets biologiques de l'IL-9 sur les devers cellules

Figure 1.2. Les types de cellules T qui sont connus pour acquérir un phénotype; cellules Th9 avec les cytokines et les facteurs de transcription nécessaires

Figure 1.3. Voies de signalisation qui favorisent la production d'interleukine 9

Figure 1.4. Résultat de la liaison et de la transcription de l'ADN coopératif IRF4

Figure 1.5. Structure globale de l'IRF4 en montrant la disposition des domaines de l'IRF4

Figure 1.6. Localisation du gène IRF4 sur le chromosome 6

Figure 1.7. La technique d'amplification PCR

Figure 1.8. Structure de l'amorce nucléotidique

Figure 2.1. La base de données « Ensembl »

Figure 2.2. Analyse de la séquence d'intérêt par Primer-BLAST

Figure 3.1. Résultat de primer-BLAST

Figure 3.2. Les résultats de « PCR In Silico »

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1. Les facteurs de transcription associés aux cellules Th9

Tableau 1.2. Molécules associées impliquées dans la différenciation des cellules Th9

Tableau 1.3. L'utilisation de différentes couples amorces du gène IRF4

Tableau 3.1. La compatibilité de notre amorce avec les conditions d'une bonne amorce

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A

A : Adénine

ADN: acide désoxy-ribonucléique

AICE: *AP-1/IRF Composite Element*

ARN: acide ribonucléique messager

B

BATF: facteur de transcription basique de la leucine comme un ATF

Bcl6: B-Cell Lymphoma 6

C

C : Cytosine

CD: cluster de différenciation

CGRP: *Calcitonin gene-related peptide*

CMH: complexe majeur d'histocompatibilité

CSIF: *Cytokine Synthesis Inhibitory Factor*

CU: colite ulcéreuse

D

DC: *Dendritique Cell*

dNTP: désoxyNucléotides-tri-phosphates

E

EAE: encéphalomyélite auto-immune expérimentale

EICE: *Ets/IRF Composite Element*

F

Foxp3: *Forkhead box P3*

G

G : Guanine

GATA3: *GATA-binding protein 3*

GITR: *Glucocorticoid-Induced TNFR-Related*

I

IFN- γ : Interféron- γ

Ig: Immunglobuline

IL: Interleukine

IL-R: Récepteur d'interleukine

ILC2: les cellules lymphoïdes innées de type 2

IRF: *Interferon Regulatory Factor*

J

JAK1: Janus Kinase 1

L

LPS: LipoPolySaccharide

M

MC: maladie de Crohn

MICI: maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

MITF: *Microphthalmia-associated transcription factor*

N

NFAT: *Nuclear Factor of Activated T cell*

NF- κ B: *Nuclear Factor kappa-light-chainenhancer of activated B*

NK: *Natural Killer*

NKT: *Natural Killer T*

O

OX40: *Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4*

P

Pb : Pair de base

PCR: *polymerase chain reaction*

PU.1: *purine-rich box-1*

Q

qPCR : *Quantitative PCR*

qRT-PCR : *Reverse transcriptase quantitative PCR*

S

SIRT1: SIRTuine 1

SNP: polymorphismes mono nucléotidiques

STAT: *Signal Transducer and Activator of Transcription*

T

T : Thymine

T-bet: *T-box transcription factor*

TAK1: *TGF- β Activated Kinase 1*

TCR: *T cell Receptor*

TFAP2A: *Transcription Factor AP-2 Alpha*

TGF- β : facteur de croissance transformant β (transforming growth factor- β)

Th: lymphocyte T helper

Tm: température de fusion

TNF - α : facteur de nécrose tumorale α (tumor necrosis factor α)

TNFR2 : récepteur 2 de TNF

Treg: lymphocyte T régulatrice

TSLP: *Thymic Stromal LymphoPoietin*

V

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*

Introduction

Les lymphocytes T proviennent d'abord de précurseurs dérivés de la moelle osseuse qui se dirigent vers le thymus, où elles terminent leurs processus de développement (Sanjabi et al., 2017). Après l'activation du récepteur de l'antigène des lymphocytes T naïves, le sort de ces cellules est déterminé dans une large mesure par l'environnement *cytokinien* et se différencient en sous-ensembles fonctionnellement distincts, y compris les cellules T helper de type 1 (Th1) sécrétant l'interféron- γ (INF- γ), les cellules Th2 sécrétant l'interleukine-4 (IL-4), les cellules Th17 sécrétant l'IL-17, et les cellules T régulatrices (Treg).

Parmi les sous-types de lymphocytes T, les Th9 produisent principalement d'IL-9 qui ont été décrites en 1994 pour la première fois et définies en 2008 (Li et al., 2016a).

Les cellules Th9 peuvent être différenciée sous la présence de TGF- β (*transforming growth factor- β*) et l'IL-4 (Shohan et al., 2018), elles sont impliquées à la fois dans la santé et la maladie. Elles ont été associées à une immunité protectrice lors d'infections parasitaires et certains types de cancer, mais également impliquées dans des états pathologiques tels que des maladies auto-immunes et inflammatoires, l'asthme allergique et quelques allergies (Vyas et al., 2020).

L'IRF4 (*Interferon Regulatory Factor 4*) est un membre de la famille des facteurs de transcription IRF qui joue un rôle important dans l'orchestration de la différenciation des cellules Th9, c'est une protéine codée par le gène du même nom (Yao et al., 2013).

Dans notre travail on va réaliser la conception des amorces spécifiques du gène IRF4 une étape clé de la PCR (*polymerase chain reaction*), une méthode populaire pour copier les acides nucléiques *in vitro* de manière semi-conservatrice (Garibyan and Avashia, 2013).

La méthode *in silico* aide à concevoir des amorces spécifiques et efficaces, Il existe plusieurs programmes disponibles pour la conception d'amorces de PCR, parmi eux, ceux fournis par la base de données NCBI que nous utiliserons.

CHAPITRE 1

Revue de la littérature

1.1. Cellule Th9	3
1.2. IRF4	10
1.3. La technique de la réaction de polymérisation en chaîne	15
1.4. Problématique et objectifs	18

CHAPITRE 1

Revue de la littérature

1.1. La Cellule Th9 :

Les lymphocytes Th9 récemment définies comme sous-ensemble de cellules auxiliaires TCD4+, se développent à partir de cellules T naïves (Th0) en présence d'IL-4 et de TGF- β (Schaper-Gerhardt et al., 2020). Elles sont généralement pro-inflammatoires, mais ont également certaines fonctions anti-inflammatoires (Deng et al., 2017).

Cependant, chez l'homme les cellules Th9 sécrètent principalement de l'IL-9 et ne sécrètent pas d'IL-10. En tant que cellules Th9 murines, elles produisent principalement l'IL-9 et l'IL-10 (Chen et al., 2019), ces cellules sécrètent également de l'IL-3, mais aussi de petites quantités d'IL-21, d'IL-22 d'IL-17, et d'INF- γ (Vegran et al., 2016).

La transduction du signal dans IL-9 / IL-9R joue un rôle important dans la croissance cellulaire, la survie et la différenciation de plusieurs types cellulaires, particulièrement dans le contrôle de T helper et la différenciation des cellules T effectrices (Yao et al., 2018). Elle peut aussi améliorer la production d'immunoglobuline E (IgE) à partir des lymphocytes B , favoriser la prolifération et la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques, aussi des mastocytes avec la production des cytokines pro-allergiques, et induit la sécrétion des chimiokines et de mucus par les cellules épithéliales (Figure 1.1) (Anuradha et al., 2016).

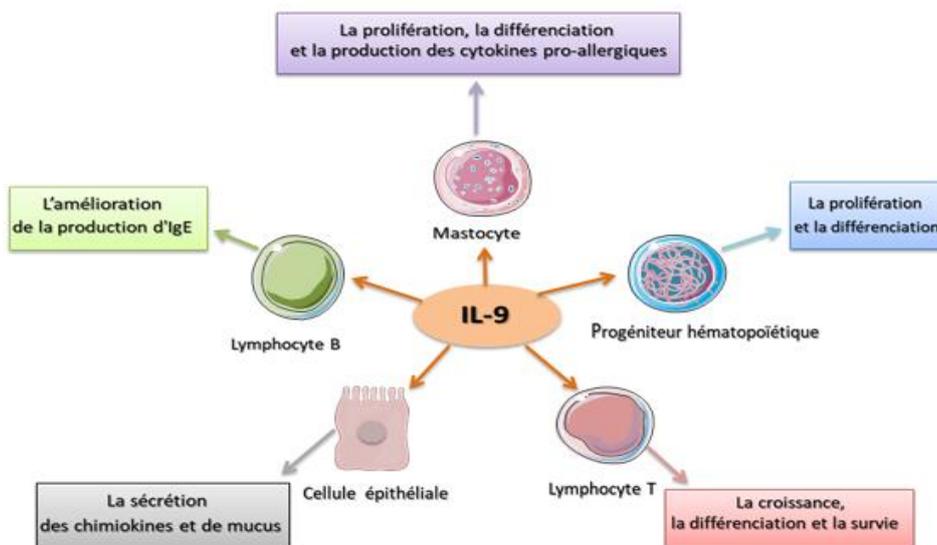


Figure 1.1. Effets biologiques de l'IL-9 sur diverses cellules

1.1.1. L'implication de Th9 en physiopathologie :

1.1.1.1. Cancer :

Les cellules Th9 présentent une activité oncogène potentielle dans certains cancers hématologiques, l'IL-9 a été attestée pour stimuler la malignité de prolifération des lymphocytes T. A l'inverse cette cytokine présente une fonction anti-cancéreuse dans les tumeurs solides par le recrutement de mastocytes dans des sites tumoraux. De plus, il est également considéré comme un facteur de croissance des mastocytes. L'IL-9 induit l'infiltration considérablement accrue des lymphocytes CD4+ et les lymphocytes T CD8+ réactifs aux tumeurs (Zheng and Lu, 2020) et inhibe la prolifération de deux lignées cellulaires tumorales de mélanome humain HTB-72 et SK-Mel-5.

En revanche l'IL-21 a entraîné la sécrétion d'IFN- γ à la fois des cellules T tueuses naturelles (NKT) et TCD8+ qui étaient toutes deux responsables de l'élimination des tumeurs. L'IL-3 dérivée des cellules TH9 pourrait favoriser la survie des cellules dendritiques (DC). Il est donc important de noter que les cellules TH9 exprimaient des niveaux importants de granzyme B (Rivera Vargas et al., 2017).

1.1.1.2. Maladies parasitaires :

Grâce à la production d'IL-9, les cellules Th9 peuvent altérer le processus de réparation des tissus, améliorer les réponses Th inflammatoires et augmenter la perméabilité intestinale selon le parasite.

Les cellules Th9 assurent également la médiation de l'activité antiparasitaire par la modification de la fonction des cellules épithéliales, en augmentant l'infiltration et la fonction immunitaire des leucocytes dans les endroits infectés (Kaplan et al., 2015). Un effet direct et puissant de l'IL-9 dans la prolifération et l'activation des mastocytes et des éosinophiles, le changement isotypique, l'hyperplasie des cellules épithéliales et l'expulsion des vers. Ainsi, des effets néfastes dans certaines infections parasitaires protozoaires, par exemple, pendant l'infection à *Leishmania major*, l'IL-9 a été décrit comme un facteur sensible qui conduisait à l'inhibition des réponses protectrices Th1 (Licona-Limón et al., 2017).

1.1.1.3. Asthme :

Les cellules Th9, présentes dans les ganglions lymphatiques drainants, et les voies respiratoires, sont fortement liées à l'asthme.

L'IL-9 dérivée de Th9 peut augmenter le dépôt de collagène, induire une hyperplasie des muscles lisses et altérer la fonction des cellules épithéliales respiratoires (Kaplan et al.,

2015). De plus, IL-9 a des effets biologiques sur diverses cellules cibles qui sont impliquées dans la pathogenèse de l'asthme.

1.1.1.4. Allergies cutanées :

L'activation des cellules Th9 peut contribuer à la physiopathologie sous-jacente au développement de troubles allergiques cutanés, les plus courants sont la dermatite de contact et la dermatite atopique.

La dermatite de contact est la réaction allergique cutanée qui se produit au contact de diverses substances. En outre, l'expression des gènes associés à Th9 et à l'IL-9 s'est avérée être élevée chez les patients atteints de cette maladie par rapport à la peau normale (Angkasekwinaï, 2019). Cependant, les rôles exacts de ces derniers restent flous (Baeck et al., 2018).

Dans les kératinocytes, l'IL-9 induit l'expression du VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) qui a été liée à l'œdème dermique, à la dilatation capillaire, et aux changements épidermiques (Clark and Schlapbach, 2017).

1.1.1.5. Maladies inflammatoires de l'intestin :

En accord avec leur rôle pro-inflammatoire, les cellules Th9 sont impliquées dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) en particulier la maladie de Crohn (MC) et la colite ulcéreuse (CU) qui sont des troubles inflammatoires chroniques du tractus gastro-intestinal.

La sécrétion de l'IL-9 dans l'intestin est capable d'affecter l'expression des protéines à jonction serrée et d'augmenter la perméabilité de la muqueuse intestinale, entraînant une intensification des réponses inflammatoires (Shohan et al., 2018). L'IL-9R est surexprimée sur les cellules épithéliales intestinales chez les patients avec MC et CU.

L'expression de l'IL-9 chez les patients atteints de CU est en lien avec l'activité de la maladie. Dans une étude, l'injection d'anticorps anti-IL-9 dans un modèle murin, pendant deux semaines, confirme le rôle de l'IL-9 dans la pathogenèse de la CU (Chakraborty et al., 2019).

1.1.1.6. Maladies auto-immunes :

L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), est un modèle animal de la sclérose en plaques, une maladie neurodégénérative inflammatoire caractérisée par une infiltration périvasculaire de cellules TCD4+ dans le système nerveux central qui entraînent

Chapitre 1. Revue de la littérature

des lésions démyélinisantes (Elyaman and Khoury, 2017). Les cellules Th9 dépendent de l'IL-9 qui a un rôle bien documenté dans la pathogenèse de l'EAE dans sa capacité à améliorer les fonctions des cellules Th1 et Th17 spécifiques de l'antigène myéline au cours de la progression de la maladie. Mais l'interaction potentielle des cellules Th9 avec ces cellules n'est pas clairement comprise (Malik et al., 2017).

Le psoriasis est une autre maladie auto-immune de la peau dans laquelle l'IL-9 joue un rôle dans le développement de lésions psoriasiques par l'inflammation et l'angiogenèse associées à la cellule Th17. De plus, l'IL-9 en ex vivo stimule la production d'IL-17 par les cellules T CD4+ ou les cellules mononucléaires du sang périphérique, en particulier dans les cellules isolées des patients atteints de psoriasis (Singh et al., 2013).

A l'aide d'un modèle de souris atteint du psoriasis et par injection intradermique d'IL-9 chez ces souris, ils ont trouvé une augmentation de l'expression d'IL-9 et d'IL-9R dans la peau et l'induction de réponses inflammatoires liées aux cellules Th17. L'expression d'IL-9R dans la peau lésionnelle des patients atteints de psoriasis s'est avérée clairement plus élevée que celle observée sur la peau saine (Deng et al., 2017).

1.1.2. Signalisation :

1.1.2.1. Différenciation :

Comme précédemment indiqué, les cellules Th9 ont été directement générées à partir des cellules Th0, mais une nouvelle étude a démontré que ces cellules peuvent représenter un état stable après la génération intermédiaire des cellules Th2 en présence de l'IL-4 et du TGF- β (Abdelaziz et al., 2020).

Plusieurs autres sous-ensembles de Th peuvent devenir des cellules Th9. Le signal via la protéine GITR (*Glucocorticoid-Induced TNFR-Related*) est le signal pour que les cellules Treg deviennent des cellules Th9, cette transition nécessite la protéine p50 et STAT6. Ainsi, les cellules Th17 peuvent acquérir un phénotype sécrétant de l'IL-9 avec la présence de l'IL-4 et IL-2 un processus qui est renforcé par l'action de l'OX40 (TNFRSF4) (*Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4*) et repose sur STAT6 et STAT5 (Figure 1.4) (Kaplan, 2017).

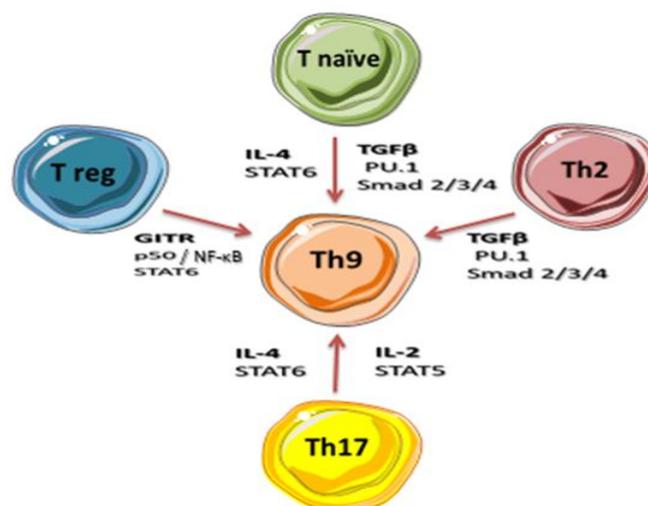


Figure 1.2. Les types de cellules T qui sont connus pour acquérir un phénotype ; cellules Th9 avec les cytokines et les facteurs de transcription nécessaires.

1.1.2.2. Régulation du développement :

La signalisation des molécules co-stimulantes et les signaux des cytokines qui favorisent la différenciation des cellules Th9, sont un réseau de facteurs de transcription qui régulent l'expression des gènes de signature des cellules Th9, dont IL-9. Contrairement aux protéines de surface et aux cytokines co-stimulantes qui stimulent la production d'IL-9 de manière aiguë.

La liaison du TGF β à son récepteur active des membres spécifiques de la famille Smad et le phosphore-Smad2/3/4 se lie directement au locus Il9. Avec l'allongement du temps de stimulation du TGF- β / Smad a activé l'IRF-4 avec le facteur de transcription basique de la leucine (BATF) et peut avoir empêché l'activité GATA3 (*GATA-binding protein 3*), conduisant à la conversion des cytokines sécrétées par les cellules Th2 de l'IL -4 à IL-9 (Tableau 1.1) (Abdelaziz et al., 2020).

Le TGF- β est requis pour le développement et la fonction de Th9 en empêchant l'expression du T-bet (*T-box transcription factor*), un facteur transcriptionnel spécifique à Th1 et en induisant l'expression de PU.1, un facteur de transcription qui favorise le développement de Th9 (Tableau 1.1) (Figure 1.5).

Tableau 1.1. Les facteurs de transcription associés aux cellules Th9.

Le facteur de transcription	La fonction
IRF4	Régule la différenciation des cellules Th9
PU.1	Facteur de transcription spécifique pour la différenciation des cellules Th9
BATF	La co-régulation par l'augmentation de la liaison d'IRF4 au promoteur Il9
GATA3	La différenciation des cellules Th9 en régulant à la baisse le niveau de Foxp3

Le TAK1 (*TGF- β Activated Kinase 1*) est un médiateur essentiel de la signalisation TGF β indépendant de Smad. TAK1 inhibe l'expression de SIRTuine 1 (SIRT1) qui fonctionne comme un inhibiteur de la production d'IL-9 (Figure 1.5).

L'IL-2 est importante pour la différenciation des cellules Th9, elle cible en aval STAT5 qui se lie directement au locus Il9 et favorise la différenciation des cellules Th9.

La voie IL-2\STAT5 inhibe l'expression du Bcl6 (*B-Cell Lymphoma 6*) et la génération de cellules Th17 (Tableau 1.2) (Li et al., 2016). La cytokine TSLP (*Thymic Stromal LymphoPoietin*) partage des caractéristiques avec l'IL-2, elle transmet des signaux via l'activation de STAT5 et inhibe le développement des cellules Th17 tout en stimulant la différenciation vers le phénotype des cellules Th9 (Figure 1.5).

Une forte costimulation des signaux indispensables est nécessaire pour le développement des cellules Th9 et une production élevée d'IL-9. Concernant la signalisation dérivée des TCR (*T cell Receptor*) et la costimulation via CD28, la translocation médiée par le TCR ou par CD28 du facteur nucléaire des cellules T activées (NFAT) au noyau contribuent à l'expression du gène Il9. La signalisation TCR facilite également l'expression du facteur de transcription l'IRF4, le cœur du développement et la fonction du Th9. Il existe une autre costimulation qui agit via la translocation de NFATc2, qui est induite par CGRP (*Calcitonin gene-related peptide*) (Figure 1.5).

Lors de l'activation du récepteur de l'IL-4, le STAT6 phosphorylé facilite la transcription de GATA3 et IRF4 qui sont deux facteurs de transcription importants à la différenciation des deux cellules Th2 et des cellules Th9. l'IFN- γ est un puissant inhibiteur de la production d'IL-9, en neutralisant les effets de l'IL-4 (Schmitt et al., 2014).

Chapitre 1. Revue de la littérature

L'IL-4 est capable d'inhiber l'induction de Foxp3 (*Forkhead box P3*) dans les cellules Treg, induisant également une population de cellules T auxiliaires qui produisent principalement de l'IL-9 (Tableau 1.2) (Figure 1.5) (Rivera Vargas et al., 2017).

Tableau 1.2. Molécules associées impliquées dans la différenciation des cellules Th9

La molécule	La fonction
TGF- β , IL-4, IL-2	Promouvoir la différenciation des cellules Th9
GITR	Promouvoir la production de cellules Th9
OX40	Promouvoir la différenciation et l'expression IL-9
TNF- α	Promouvoir la différenciation, la survie et la prolifération des cellules Th9
IFN- γ	Inhibe la différenciation Th9 et la sécrétion d'IL-9

De plus, d'autres voies de signalisation ont été identifiées améliorant la production d'IL-9 par les cellules Th9.

Les cytokines accessoires agissent pour induire la voie NF- κ B (IL-1, IL-33 et IL-25) ou agissent via STAT1 pour induire l'expression du facteur de transcription IRF1 (IL-1 β , IFN $\alpha\beta$). L'IRF1 augmente l'expression et la production des cytokines IL-9 et IL-21 en collaboration avec les facteurs clés de la polarisation des cellules Th9 (IRF4, BATF, et PU.1) (Figure 1.5) (Kaplan et al., 2015).

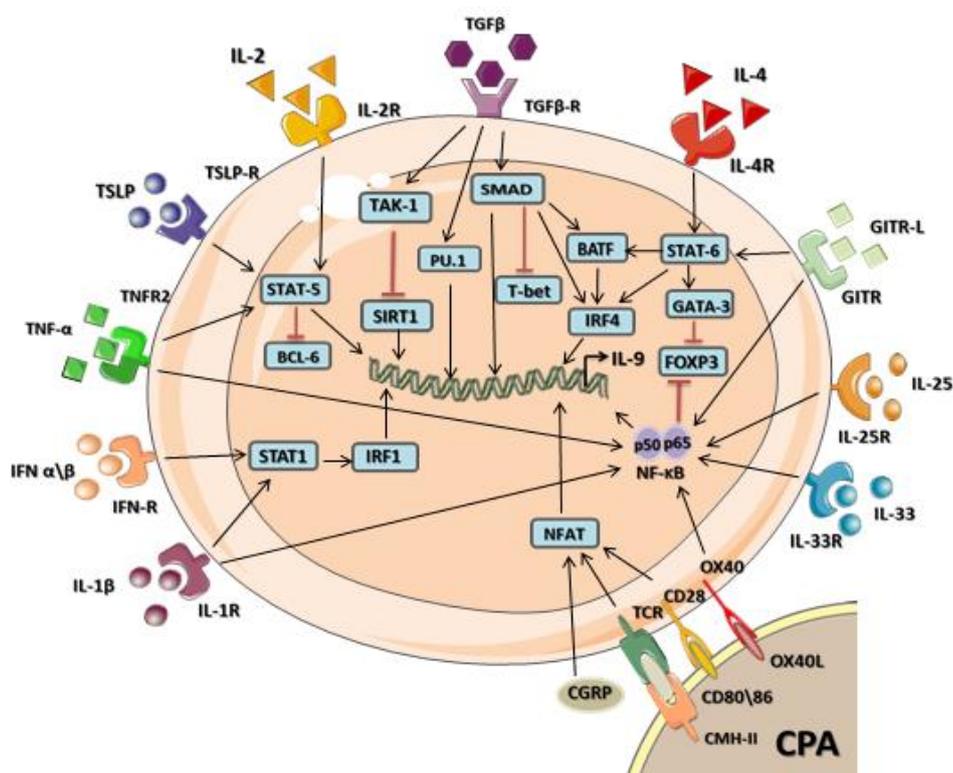


Figure 1.3. Voies de signalisation qui favorisent la production d'interleukine 9.

Les signaux TGF- β active le PU.1 et La protéine Smad 2/3/4 interagit avec IRF4 pour induire IL-9 par une liaison directe au promoteur, pour favoriser la différenciation des cellules Th9. TAK1 un de la signalisation TGF β inhibe l'expression de SIRT1 un inhibiteur de la production d'IL-9. La signalisation IL-4 favorise la différenciation Th9 en activant STAT6 pour réprimer Foxp3. Une voie dépendante de STAT5 a également été proposée, où IL-2, ou TSLP conduisent à la phosphorylation de STAT5, avec une liaison ultérieure de STAT5 au promoteur *IL9* et inhibant l'expression du Bcl6. Le TNF- α influence la différenciation des cellules Th9 par la voie de signalisation TNFR2-STAT5 et la voie de signalisation NF- κ B. PU.1 peut se combiner directement avec la région du promoteur *IL-9* et augmenter l'inhibition de GATA3 sur Foxp3. IRF4 avec le corégulateur BATF régule la différenciation des cellules Th9 en se combinant avec la région du promoteur *IL-9*. Le GITR induit la production d'IL-9 en inhibant l'expression de Foxp3 qui nécessite NF- κ B. Les cytokines accessoires agissent pour induire NF- κ B (IL-1, IL-25 et IL-33) ou agissent via STAT1 pour induire l'expression d'IRF1 (IFN I, IL-1 β). Les molécules costimulantes jouent également un rôle important dans la transcription *IL9* lors de l'interaction avec les cellules présentant l'antigène, principalement par activation de NFAT (TCR, CD28, OX40, CGRP) et NF- κ B (OX40).

1.2. IRF4 :

1.2.1. Définition :

L'IRF4, également connu sous le nom de LSIRF, MUM1 et PIP (Nam and Lim, 2016), une protéine appartenant à la famille des facteurs de transcription IRF, qui comprennent 9 membres de l'IRF1 à l'IRF9, et qui jouent un rôle essentiel dans la régulation transcriptionnelle des IFN de type I et dans la modulation du système immunitaire.

L'IRF4 est hautement homologué à IRF8 (Nam et al., 2016), et exprimé dans diverses cellules hématopoïétiques, y compris les cellules T, les cellules B, les macrophages

Chapitre 1. Revue de la littérature

et les sous-ensembles de cellules dendritiques (Tang et al., 2019), mais récemment, elle a été détectée dans le foie, le cœur, le cerveau et les reins (Remesh et al., 2015).

De nouvelles études ont identifié que l'IRF4 régule les enzymes impliqués dans la lipolyse dans les adipocytes. Par conséquent, la suppression spécifique de l'adipocyte par l'IRF4 induit une synthèse lipidique améliorée, qui résulte d'une homéostasie lipidique dérégulée, et par conséquent conduit à une obésité (Shukla and Lu, 2014).

Dans les cellules B, l'IRF4 régule la signalisation des récepteurs des cellules B, contribue à la recombinaison des commutateurs de classe, à la réponse du centre germinal et à l'hypermutation somatique, il est également essentiel pour le développement des plasmocytes.

Ce facteur de transcription favorise la différenciation des macrophages et empêche la génération de cellules suppressives dérivées des myéloïdes. Dans les cellules dendritiques l'IRF4 contribue à la régulation de la présentation de l'antigène (Asslaber et al., 2019).

Concernant les lymphocytes T, l'IRF4 est rapidement exprimée dans les heures suivant la stimulation du TCR, et son niveau d'expression dépend de l'affinité du récepteur TCR.

L'IRF4 contrôle la différenciation des cellules T CD8+, Th2, Th9, Th17, Th folliculaires, Treg et T cytotoxiques.

Les cellules T déficientes en IRF4 présentent un grave défaut fonctionnel dans les réponses immunitaires induites par ces cellules T, notamment une allergie, une auto-immunité, une infection microbienne, et une réaction du greffon contre l'hôte (Wu et al., 2017).

La protéine IRF4 est également impliquée dans la prolifération et la survie des cellules et identifiée comme un marqueur diagnostique et pronostique pour plusieurs tumeurs malignes hématologiques (Qian et al., 2017). De plus, la recherche a révélé que l'IRF4 est exprimée dans un large éventail de cancers de la peau (Wang et al., 2014).

1.2.2. IRF4, facteur majeur de la polarisation TH9 :

Contrairement au IRF1 et IRF2, qui sont régulés à la hausse par la signalisation IFN, l'expression d'IRF4 n'est pas essentiellement induite par les IFN de type I ou II, mais par d'autres stimuli, y compris l'engagement des récepteurs d'antigènes, la signalisation induite par le CD40 ou l'interleukine ou la stimulation avec le LipoPolySaccharide (LPS) (Huber and Lohoff, 2014). En fait, il a été démontré que l'IRF-4 fonctionne en lien, dans le développement des cellules Th9, avec le BATF qui appartient à la superfamille AP1 / ATF

Chapitre 1. Revue de la littérature

des facteurs de transcription. Le complexe IRF4-BATF se lie à un élément d'ADN composite nommé AICE (*AP-1/IRF Composite Element*) (Figure 1.6) (Malik and Awasthi, 2018).

Les cellules Th9 nécessitent une interaction coordonnée des facteurs de transcription en aval du signal TGF- β , IL-4, IL-6 et GITR. En collaboration avec IRF4, les protéines Smad sont importantes pour le développement de Th9 et conduisent à l'expression d'IL-9. Après stimulation avec TGF- β , Smad2 et Smad3 ont été recrutés pour le promoteur IL9 en interagissant avec l'IRF4, le complexe a stimulé la modification de la chromatine active pour initier la transcription.

IRF4 et Smad se sont tous deux liés aux mêmes régions de régulation IL9 CNS dans CNS0, CNS1 et CNS2, la liaison à IRF4 était renforcée par les conditions de la cellule Th9 (Tamiya et al., 2013). L'expression du facteur de transcription IRF4, cible de l'IL-4 dans le développement des cellules Th9. STAT6 est activée en aval de la cytokine IL-4. Elle est indispensable pour la production d'IL-9, et aussi pour l'expression de BATF et IRF4. Les deux facteurs se lient ensuite au promoteur IL9.

La protéine IRF4 est également une cible de STAT5 dans les cellules Th9 en cas de stimulation avec l'IL-2. Il se lie avec BATF au promoteur IL9 pour maintenir la production d'IL-9 dans ces cellules Th9.

L'IRF4 pourrait réguler la différenciation des cellules Th9 avec PU.1 via la liaison avec EICE (*Ets/IRF Composite Element*) (Figure 1.6) (Figure 1.7) (Goswami, 2017).

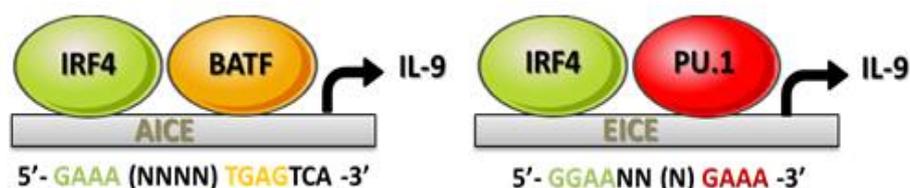


Figure 1.4. Résultat de la liaison et de la transcription de l'ADN coopératif IRF4 (Agnarelli et al., 2018). L'IRF4 lie le motif de liaison à l'ADN (EICE) avec des membres de la famille Ets (PU.1) ou le motif (AICE) avec des membres de la famille AP-1 (BATF).

1.2.3. Structure :

L'IRF4 comprend un domaine de liaison à l'acide désoxy-ribonucléique (ADN) N-terminal (DBD) hautement conservé avec cinq répétitions de tryptophane et accompagné d'un domaine d'activation d'interféron (IAD) C-terminal, qui régule l'activité transcriptionnelle des IRF en médiant les interactions protéine-protéine via un domaine de liaison (LKD) comme tous les autres membres de l'IRF (Li et al., 2019). Il contient également un domaine

Chapitre 1. Revue de la littérature

auto-inhibiteur (AR) et un signal de localisation nucléaire qui conduit au blocage de l'activité DBD par contacts hydrophobes (Nam and Lim, 2016).

Le domaine LKD, qui est censé être plié interagit avec les domaines DBD et IAD. Le domaine DBD ressemble à un motif hélice-tour-hélice, ailé avec un faisceau à 3 hélices α et une feuille bêta antiparallèle à 4 brins aussi deux grandes boucles (entre $\beta 2$ et $\alpha 2$ et $\alpha 2$ et $\alpha 3$).

La troisième hélice α se glisse dans la majeure rainure de la sous-séquence 5'-GAAA-3', elle est le principal déterminant de liaison spécifique à la séquence par des contacts établis sur la face hydrophile avec le squelette phosphate par des résidus d'arginine. Ainsi, trois des cinq résidus du tryptophane invariants entrent en contact avec l'ADN (Agnarelli et al., 2018). Le domaine IAD forme une faucille avec quatre hélices α entourant un canon β (de $\beta 1$ à $\beta 11$).

Les hélices $\alpha 1$, $\alpha 3$ et $\alpha 4$ forment un faisceau d'hélices et se situent à l'extrémité de la molécule où se trouvent ainsi les extrémités N et C-terminales du domaine. À l'extrémité opposée du domaine l'hélice $\alpha 2$ se trouve et s'emballe librement contre l'une des feuilles β .

De plus, cinq boucles longues relient divers éléments de structure secondaire qui dépassent du noyau principal du domaine. Dans les 30 derniers résidus, une région flexible AR qui réside de l'IAD responsable de la faible affinité de liaison entre l'IRF4 et l'ADN. Ce domaine interagit physiquement avec le DBD et maintient la protéine IRF4 dans un état auto-inhibé (Remesh et al., 2015).

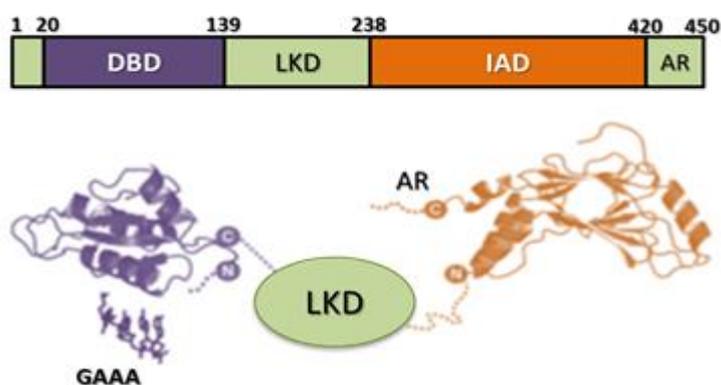


Figure 1.5. Structure globale de l'IRF4 en montrant la disposition des domaines de l'IRF4 (Agnarelli et al., 2018).

Chapitre 1. Revue de la littérature

Bien que l'IRF4 se lie faiblement à l'ADN, la liaison spécifique à des partenaires d'hétérodimérisation comme BATF et PU.1 soulage l'auto-inhibition, permettant une liaison de l'ADN et la reconnaissance de haute affinité (Cherian et al., 2018).

1.2.4. Gène *IRF4* :

Le gène *IRF4*, connue également sous le nom *MUM1*, *LSIRF* et *NF-EM5*, se situe sur le chromosome 6 à l'extrémité télomérique du bras court (6p25.3), entre les gènes *DUSP22* (double spécificité phosphatase 22) et *EXOC2* (composant complexe exocyste 2).

La localisation de pairs de bases commence à 391739 et se termine à 411443 pb de pter. *IRF4* est un gène de 19,4 kb avec 10 exons et 11 introns (d'après NCBI), l'exon 1, la partie 5' de l'exon 2 et la partie 3' de l'exon 9 sont non codants.

La longueur de la transcription est de 5314 b et la séquence de codage : CDS 114-1469. Par contre l'acide ribonucléique messenger (ARNm) est exprimé à des niveaux élevés dans les tissus lymphoïdes, dans la peau et également dans les amygdales.

Des mutations somatiques ont été identifiées dans un petit sous-ensemble (1,5%) de patients atteints de leucémie lymphoïde chronique dans le domaine de liaison à l'ADN d'*IRF4*, et concernant des mutations germinales. Des polymorphismes mono nucléotidiques (SNP) ont été identifiés chez des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique et de mélanome dans le locus du gène *IRF4* (Figure 1.9) (Shukla and Lu, 2014).

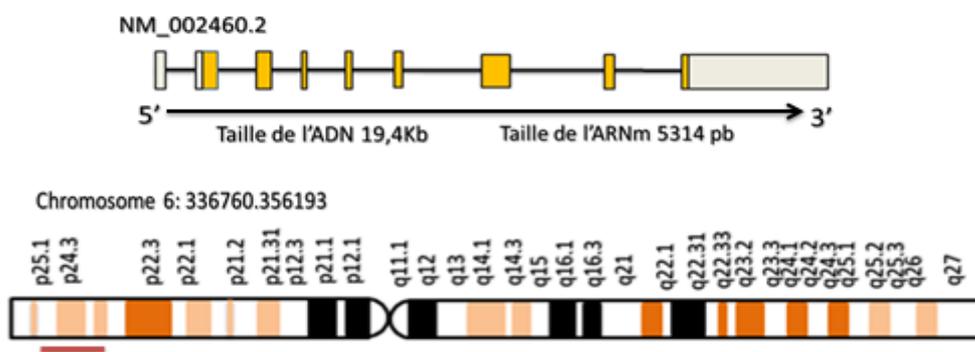


Figure 1.6. Localisation du gène *IRF4* sur le chromosome 6 (Shukla and Lu, 2014).

Le gène *IRF4* est impliqué dans la pigmentation, un SNP dans l'intron 4 du gène *IRF4* est fortement associé à la couleur des cheveux et des yeux, aux tâches de rousseur, à la couleur de la peau, au nombre de nævus et à la réponse au bronzage. Ce SNP se trouve dans les mélanocytes dans un amplificateur de transcription *IRF4*.

Chapitre 1. Revue de la littérature

L'allèle associé à ce phénotype de pigmentation altère la liaison du TFAP2A (*Transcription Factor AP-2 Alpha*), un facteur de transcription qui conjointement avec le MITF (*Microphthalmia-associated transcription factor*), régule l'activité de l'activateur. Ce dernier coopère avec L'IRF4 pour activer l'expression de la tyrosinase, l'enzyme de pigmentation (Visser et al., 2015).

Le gène IRF4, est similaire à plusieurs autres gènes classiques suppresseurs de tumeurs tels que p16 INK4a, p15 INK4b, ou p53. Ce gène peut être sujet à des altérations du statut de méthylation du promoteur entraînant des changements d'expression, ce qui pourrait participer à l'initiation et / ou à la progression du cancer.

De plus, une abondante expression de l'IRF4 s'est avérée être un marqueur de nombreux sous-ensembles de lymphomes, y compris, le lymphome à épanchement primaire, les lymphomes diffus à grandes cellules B, le lymphome de la zone marginale et la leucémie à cellules T adulte. De plus, une régulation négative du gène *IRF4* peut stimuler la leucémogénèse dans le contexte des cellules myéloïdes (Ortmann, 2005).

1.3. La technique de la réaction de polymérisation en chaîne :

1.3.1. Définition :

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) est le fondement et probablement la technique clé de nombreuses techniques spécialisées de biologie moléculaire, elle a été développée dans les années 80. La PCR permet la synthèse de très faibles quantités d'acides nucléiques en très grandes quantités in vitro pouvant être utilisées directement ou dans des applications en aval (Waters and Shapter, 2014).

1.3.2. Principe :

La PCR permet la synthèse de fragments d'ADN spécifiques in vitro à l'aide d'une enzyme ADN polymérase, qui lit un brin d'ADN matrice et utilise les composants de la réaction mélange, catalyse l'addition de bases désoxyNucléotides-tri-phosphates (dNTP) libres à un ADN qui forme avec l'ADN matrice un complément via l'appariement de bases, car un court fragment d'ADN appelé amorce est connecté à l'un des brins d'ADN matrice dans le site spécifique choisi pour démarrer la synthèse. Enfin, le résultat est l'amplification d'une séquence d'ADN particulière en de nombreuses copies (Basu, 2015).

1.3.3. Acteurs :

- L'ADN matrice : est une séquence qui contient le fragment à amplifier, généralement elle est sous forme de double-brin.
- Les nucléotides : comprennent les quatre dNTP (dGTP, dATP, dTTP, dCTP), ceux-ci agissent comme les blocs de construction qui sont utilisés par l'ADN polymérase pour créer le produit de PCR résultant.
- Deux amorces sens et anti-sens : appelés également les oligonucléotides, sont des courts fragments d'ADN simple brin avec une séquence définie complémentaire à l'ADN matrice.
- L'ADN polymérase : l'enzyme clé qui relie les nucléotides pour former le produit de PCR, Taq polymérase est largement utilisée, une enzyme qui a été isolée d'une bactérie qui tire son origine de sources chaudes.
- Tampon d'amplification: contenant du MgCl₂ (tel que fourni par le fabricant de Taq polymérase) (Green and Sambrook, 2018; Marx, 2016).

1.3.4. Étapes :

Les acteurs sont mélangés dans un tube à essai ou une plaque à 96 puits, puis placés dans une machine qui est essentiellement un thermocycleur. Elle porte un bloc thermique avec des trous, dans lequel les tubes à essai ou les plaques sont insérés et permet à des cycles répétés d'amplification d'ADN de se produire en trois étapes majeures (Figure 1.10) (Garibyan and Avashia, 2013) :

- La dénaturation : d'une minute à 94 ° C, la machine élève et abaisse la température du bloc par étapes discrètes, préprogrammées et précises, la solution réactionnelle est chauffée d'abord au-dessus du point de fusion des deux brins d'ADN complémentaires de l'ADN cible, ce qui permet la séparation des brins.
- L'hybridation : idéalement entre 52 ° C à 58 ° C de 30 secondes, dans ce processus la température est ensuite abaissée pour permettre aux amorces spécifiques de se lier aux segments d'ADN cibles.
- L'élongation : La température est à nouveau élevée, moment auquel l'ADN polymérase est susceptible d'étendre les amorces en ajoutant des nucléotides au brin d'ADN en développement, le Taq polymérase a une température d'élongation optimale de 70 ° C à 80 ° C et nécessite 1 minute.

À chaque répétition de ces étapes, le nombre de molécules d'ADN copiées double.

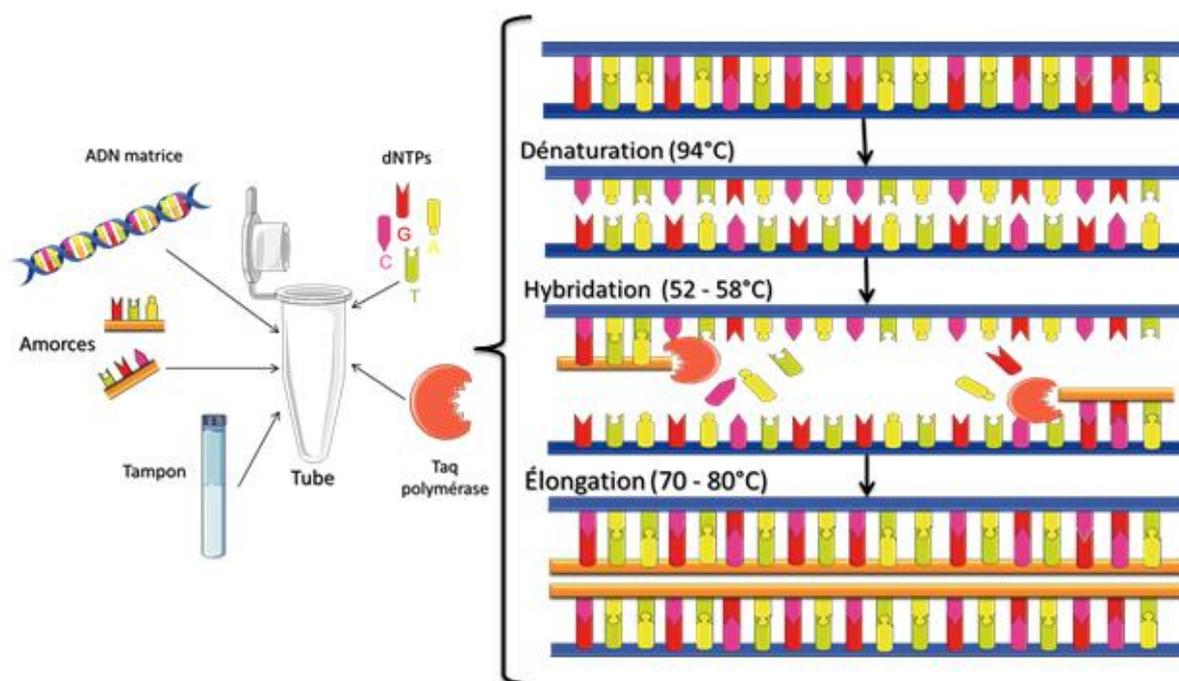


Figure 1.7. La technique d'amplification PCR.

1.3.5. Choix d'amorce :

1.3.5.1. Définition :

L'amorce oligonucléotidique (primer) est un petit segment d'acide nucléique qui sert de point d'extension, sur lequel l'ADN polymérase peut s'appuyer et initier son travail. Pour une spécificité et efficacité maximale de la PCR, elle peut être conçue à l'aide d'outils et de logiciels de bioinformatique (Figure 1.11) (Kumar and Chordia, 2015).

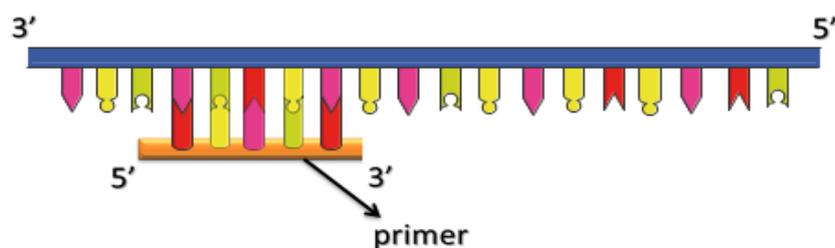


Figure 1.8. Structure de l'amorce nucléotidique.

Chapitre 1. Revue de la littérature

Un certain nombre de paires d'amorces ont été précédemment obtenus à partir du même gène sur lequel nous avons travaillé, et plusieurs études ont été menées via des types de PCR utilisés par des chercheurs. Le tableau ci-dessous contient des exemples d'expériences qui ont déjà été réalisées soit par la qPCR (quantitative PCR) ou par la qRT-PCR (*Reverse transcriptase quantitative PCR*).

Tableau 1.3. L'utilisation de différents couples amorces du gène IRF4.

Couple d'amorce	But à identifier	Test	Cellules	Référence
Forward primer : 5'-TGGGCTGT- -TTCTGCTTATTTTGT-3 ' Reverse primer : 5'-ATGCCAAAGCTACCTAAACAAAACA-3 '	Rejet après transplantation hépatique	qPCR	Foie congelé	(Tang et al., 2015)
Forward primer : 5'-AG-CGC-ATT-TCA-GTA-AAT-GTA-AAC-ACA-T-3' Reverse primer : 5'-TCT-TGT-GTT-CTG-TAG-ACT-GCC-ATC-A-3 '	Leucémies aiguës de l'enfance	qRT-PCR	Leucocytes / myélocytes BM	(Adamaki et al., 2013)
Forward primer : 5'-CCATGACAACGCCTTACCCT-3' Reverse primer : 5'-TTATGCTTGGCTCTGTGGGG-3'	Myasthénie	qPCR	Cellules B	(Zhang et al., 2018)

<p>Forward primer : 5'-CTACACCATGACAACGCCTTACC-3'</p> <p>Reverse primer : 5'-GGCTGATCCGGGACGTAGT-3'</p>	<p>Cancer du poumon non à petites cellules (NS CLC)</p>	<p>qPCR</p>	<p>NSCLC conjugué et du tissu pulmonaire non néoplasique adjacent</p>	<p>(Qian et al., 2017)</p>
<p>Forward primer : 5'-GCCCAACAACTGGAGAGAG-3'</p> <p>Reverse primer : 5'-AGGTTCTACGTGAGCTGTGATG-3'</p>	<p>Déficit immunitaire variable commun (CVID)</p>	<p>qPCR</p>	<p>Cellules B</p>	<p>(Afshar- Ghase mlou et al., 2019)</p>

1.3.5.2. Les outils :

Divers programmes de bioinformatique sont disponibles pour faciliter la conception de paires d'amorces à partir de la séquence de modèles, l'outil de conception NCBI Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) pourrait être utile afin d'exécuter une recherche sur NCBI pour vérifier la spécificité cible des amorces (Lorenz, 2012; Qu and Zhang, 2015).

1.4. Problématique et objectifs :

1.4.1. Problématique:

Les cellules Th9 se caractérisent par une production élevée d'IL-9, elles ne sont cependant pas clairement comprises surtout à cause de leur rôle dans divers processus physiologiques et les fonctions pléiotropes de l'IL-9 sur plusieurs types cellulaires. Les cellules Th9 se caractérisent principalement par le facteur de transcription IRF4 qui se lie au locus *IL9* et assure la production de l'IL-9. Par conséquent, les chercheurs ont-besoin d'une conception d'amorces du gène IRF4 pour réaliser le test PCR afin de mieux connaître l'effet de l'IRF4 sur les cellules Th9, cela correspond à ce que nous avons réalisé dans ce travail.

1.4.2. Objectif :

Concevoir des amorces du gène IRF4 pour la réalisation de PCR à partir de la séquence de modèle.

1.4.3. But :

Vérifier la spécificité et l'efficacité des amorces qui encadrent le gène IRF4 afin de faciliter aux chercheurs la réalisation de la PCR.

CHAPITRE 2

Matériels et méthodes

2.1. Conception d'amorces	22
2.2. Sélection d'amorces	22
2.3. La séquence du gène IRF4	23
2.4. Le design de primer	24
2.5. Les conditions de choix de la bonne amorce	25

CHAPITRE 2

Matériels et méthodes

2.1. Conception d'amorces :

Les amorces sont sans doute les composants les plus critiques pour la technique de PCR, grâce à leurs propriétés qui contrôlent la spécificité et la sensibilité qui rendent ce test particulièrement puissant. Par conséquent, la conception d'amorces appropriées est probablement le facteur le plus important affectant la PCR, donc une mauvaise conception combinée à une incapacité à optimiser les conditions de réaction peuvent entraîner une précision réduite et une détection de faux positifs ou négatifs des cibles d'amplification (Bustin and Huggett, 2017).

2.2. Sélection des amorces :

Le processus de conception comprend différentes étapes, qui utilisent des paramètres spécifiques pour produire des oligonucléotides spécifiques donnant des produits de PCR de bonne qualité (Hendling et al., 2018) :

2.2.1. La spécificité :

Il est important que les amorces se lient seulement à leur ADN cible prévue, cela implique la prévention de la liaison non spécifique à d'autres séquences d'ADN d'autres régions au sein d'une matrice.

D'abord, un ensemble bien défini de séquences cibles basées sur une gestion fiable des données constitue la base de la conception d'amorces spécifiques. Toute la réaction peut échouer si ces séquences ne sont pas choisies correctement, car les séquences sélectionnées pour la conception ne correspondent pas aux séquences de l'ADN cible réel utilisé dans la réaction. Ensuite, les amorces ne devraient pas se lier à d'autres cibles (Hendling and Barišić, 2019).

2.2.2. La complémentarité :

L'extrémité 3' d'une seule amorce ne peut pas être complémentaire d'autres séquences de la même amorce et les extrémités 3' d'un ensemble d'amorces, qui comprend une amorce sens et une amorce antisens, ne doivent pas être complémentaires l'une de l'autre.

Chapitre 2. Matériels et méthodes

Ces deux scénarios entraînent la formation de structures de boucles en épingle à cheveux, et de dimères d'amorces respectivement (Lorenz, 2012).

2.2.3. La longueur de l'amorce :

La longueur optimale pour une amorce est comprise entre 18 et 24 nucléotides, chaque nucléotide supplémentaire augmente la spécificité d'une amorce d'un facteur quatre. Cependant, plus un oligonucléotide est long, plus il est capable de former des structures secondaires qui ont un effet négatif sur l'efficacité du test PCR (Biaassoni and Raso, 2020).

2.2.4. La température de fusion (T_m) :

La connaissance de la T_m des amorces est impérative car elle représente la valeur la plus critique pour effectuer une expérience PCR réussie. Généralement la température de fusion T_m d'une paire d'amorces doit se situer entre 50°C et 62°C. Une bonne paire d'amorces doit avoir une différence des températures de fusion ne dépassant pas les 5°C à cause de la présence des deux amorces placées dans le même tube lors de la PCR (Chuang et al., 2013).

2.2.5. La teneur en GC :

Une proportion GC appropriée est généralement de l'ordre d'environ 50% GC. Un contenu GC élevé peut rendre les amorces « collantes » et augmenter les risques de mauvais amorçage dans les régions indésirables du modèle. Les étirements poly-C et poly-G peuvent conduire à une hybridation non spécifique à de longs tronçons GC dans l'ADN matrice. En outre, de longs tronçons de poly-A et poly-T peuvent conduire à un appariement instable et ouvrir le duplex amorce-séquence cible (Hung and Weng, 2016).

2.2.6. La séquence à l'extrémité 3' :

Un amorçage non spécifique peut être minimisé en sélectionnant des oligonucléotides qui n'ont qu'un ou deux G ou C dans les extrémités 3', car une teneur en GC plus élevée à cette extrémité de l'oligonucléotide peut inhiber l'hybridation du reste de la séquence d'amorce et diminuer la spécificité de la réaction. Cependant, il est recommandé que les amorces contiennent un nucléotide G ou C à l'extrémité 3' afin d'assurer une bonne et forte liaison au modèle (Rodríguez et al., 2015).

2.3. La séquence du gène IRF4 :

Nous avons utilisé la base de données « Ensembl » dans la plateforme «www.Ensembl.org» pour extraire la séquence du gène IRF4 comme indiqué dans la figure.

The screenshot shows the Ensembl genome browser interface for the gene IRF4. The left sidebar contains a navigation menu with 'Sequence' highlighted. The main content area displays the following information:

- Gene: IRF4** ENSG00000137265
- Description:** interferon regulatory factor 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6119]
- Gene Synonyms:** LSIRF, MUM1
- Location:** Chromosome 6: 391,752-411,443 forward strand. GRCh38: CM000668.2
- About this gene:** This gene has 5 transcripts (splice variants), 286 orthologues, 8 paralouques, is a member of 1 Ensembl protein family and is associated with 79 phenotypes.
- Transcripts:** A table with columns: Name, Transcript ID, bp, Protein, Biotype, CCDS, UniProt, RefSeq Match, and Flags.

Name	Transcript ID	bp	Protein	Biotype	CCDS	UniProt	RefSeq Match	Flags
IRF4-201	ENST00000380956.9	5314	451aa	Protein coding	CCDS4469.9	Q15309.9	NM_002460.4	TSL:1 GENCODE basic APPRIS P1 MANE Select v0.8
IRF4-204	ENST00000493114.1	1607	410aa	Nonsense mediated decay	-	F2Z3D5.9	-	TSL:5
IRF4-205	ENST00000495137.5	757	No protein	Processed transcript	-	-	-	TSL:3
IRF4-202	ENST00000468495.5	473	No protein	Processed transcript	-	-	-	TSL:5
IRF4-203	ENST00000469834.1	346	No protein	Processed transcript	-	-	-	TSL:3

Below the table, there is a 'Marked-up sequence' section with a 'Download sequence' button and a 'BLAST this sequence' button. A small box indicates 'Exons IRF4 exons All exons in this region' and 'Markup loaded'.

Figure 2.1. La base de données « Ensembl ».

L'exon 2 a été choisi, dans cette étude, pour le design des amorces l'encadrant.

2.4. Le design de primer

Pour concevoir les amorces recherchées, nous avons utilisé le logiciel Primer-BLAST fournis par le « National Centre for Biotechnology Information » (NCBI) à travers le site « www.Ncbi.nlm.nih.Gov ».

Il est nécessaire de copier la séquence d'intérêt encadrée (exon 2) dans « PCR Tempmate » sans oublier de supprimer les espaces supplémentaires afin de condenser la séquence. Ensuite, renseigner la position du nucléotide du départ et de fin de l'amorce sens et de l'amorce antisens.

Enfin, vous pouvez découvrir les résultats en cliquant sur le bouton " Get Primers ".

Chapitre 2. Matériels et méthodes

The image shows the Primer-BLAST web interface. The top navigation bar includes the NIH logo, 'U.S. National Library of Medicine', 'NCBI National Center for Biotechnology Information', and a 'Sign in to NCBI' link. The main title is 'Primer-BLAST' with the subtitle 'A tool for finding specific primers'. Below this, there are links for 'Reset query', 'Save search parameters', 'Retrieve recent results', 'Publication', and 'Tips for finding specific primers'. The 'PCR Template' section contains a text input field for 'Enter accession, gi, or FASTA sequence' (circled in red) and a 'Range' section with 'From' (1) and 'To' (328) fields (circled in red), and 'Forward primer' and 'Reverse primer' fields (590). Below this is a 'Primer Parameters' section with fields for 'Use my own forward primer', 'Use my own reverse primer', 'PCR product size' (Min: 70, Max: 1000), '# of primers to return' (10), and 'Primer melting temperatures (T_m)' (Min: 57.0, Opt: 60.0, Max: 63.0, Max T_m difference: 3). The 'Exon/intron selection' section includes 'Exon junction span' (No preference), 'Exon junction match' (Min 5' match: 7, Min 3' match: 4, Max 3' match: 8), 'Intron inclusion' (checkbox), and 'Intron length range' (Min: 1000, Max: 1000000). The 'Primer Pair Specificity Checking Parameters' section has a 'Specificity check' checkbox, 'Search mode' (Automatic), 'Database' (circled in red), 'Exclusion' (checkbox), 'Organism' (Homo sapiens), 'Entrez query (optional)', 'Primer specificity stringency' (Primer must have at least 2 total mismatches to unintended targets, including at least 2 mismatches within the last 5 bps at the 3' end; ignore targets that have 6 or more mismatches to the primer), 'Max target size' (4000), and 'Allow splice variants' (checkbox). At the bottom, there is a 'Get Primers' button (circled in red) and checkboxes for 'Show results in a new window' and 'Use new graphic view'. A note at the bottom right states 'Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow'.

Figure 2.2. Analyse de la séquence d'intérêt par Primer-BLAST.

2.5. Les conditions de choix de la bonne amorce :

- Choisir la paire d'amorces qui donne le produit spécifique moins de 1000 afin d'amplifier que le produit étudié.
- Les produits aspécifiques de la paire d'amorces doivent être tous supérieurs à 1000 bases, parce que lors d'une PCR il est moins probable d'amplifier une séquence de plus de 1kb.
- La teneur en GC doit être proche de 40%.
- Lors de la PCR la température d'hybridation est programmée en une seule valeur, donc les températures d'hybridation de chaque amorce doivent être aussi proche que possible les unes des autres.

CHAPITRE 3

Résultats

3.1. Résultats de la conception d'amorces	27
3.2. Interprétation des résultats	28
3.3. Confirmation des résultats	28

CHAPITRE 3

Résultats

3.1. Résultats de la conception d'amorces :

Initialement, toutes les paires d'amorces résultantes par l'outil Primer-Blast présentaient chacune des produits aspécifiques moins de 1000 pb. Ceci est incompatible avec les conditions requises, et pour cela nous avons dû élargir la séquence à amplifier pour fournir un choix de séquences plus large pour les amorces dans le logiciel. Par la suite nous avons pu avoir 4 paires d'amorces hautement spécifiques, et le choix s'est porté sur la troisième paire d'amorces assurant un produit spécifique de taille égale à 821 pb et moins des produits aspécifiques dont tous ces derniers ont une taille supérieure à 1000 pb (ce qui empêche leur amplification) (figure 3.1).

Primer pair 3										
	Sequence (5'>3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity	
Forward primer	GGTGC GTTACAGGAGAGCAG	Plus	20	6	25	60.74	60.00	3.00		1.00
Reverse primer	AAACCCCTCAAGCCTTTGGC	Minus	20	826	807	61.12	55.00	5.00		3.00
Product length	821									
Products on potentially unintended templates										
>NC_000005.12 Homo sapiens chromosome 6, GRCh38.p12 Primary Assembly										
product length = 621										
Features associated with this product:										
interferon regulatory factor 4 isoform 1										
interferon regulatory factor 4 isoform X1										
Forward primer	1 GGTGC GTTACAGGAGAGCAG	20								
Template	392837	392856								
Reverse primer	1 AAACCCCTCAAGCCTTTGGC	20								
Template	393657	393638								
>NC_000004.12 Homo sapiens chromosome 4, GRCh38.p12 Primary Assembly										
product length = 3102										
Features associated with this product:										
actin-binding LIM protein 2 isoform X9										
actin-binding LIM protein 2 isoform X29										
Forward primer	1 GGTGC GTTACAGGAGAGCAG	20								
Template	8042184 ...A.AG.....G....	8042165								
Reverse primer	1 AAACCCCTCAAGCCTTTGGC	20								
Template	8039083 T.T.....A..G....	8039102								
>NC_000002.12 Homo sapiens chromosome 2, GRCh38.p12 Primary Assembly										
product length = 3895										
Features flanking this product:										
18159 bp at 5' side: @VCOBORIN-C isoform 3										
180724 bp at 3' side: testis-expressed protein 51 isoform X5										
Forward primer	1 GGTGC GTTACAGGAGAGCAG	20								
Template	126714300	126714319								
Forward primer	1 GGTGC GTTACAGGAGAGCAG	20								
Template	126718194 ..CTG.GG.....	126718175								
product length = 1482										
Features associated with this product:										
putative ciliary rootlet coiled-coil protein 2										
putative ciliary rootlet coiled-coil protein 2 isoform X1										
Forward primer	1 GGTGC GTTACAGGAGAGCAG	20								
Template	240948011 CA.C.C.....C...	240948030								
Reverse primer	1 AAACCCCTCAAGCCTTTGGC	20								
Template	240949492 GG.....G..C.....G	240949473								

Figure 3.1. Résultat de primer-BLAST.

Chapitre 3. Résultats

3.2. Interprétation des résultats :

Grâce au logiciel Primer-BLAST et à l'aide du site Ensembl, nous avons pu trouver la paire d'amorces appropriée pour l'amplification d'une partie du gène *IRF4*, cette paire d'amorces sert à amplifier l'exon 2 et qui présente toutes les caractéristiques requises d'une bonne paire d'amorces.

Nous avons obtenus des oligonucléotides d'une longueur de 20 nucléotides pour l'amorce sens et pour l'amorce anti-sens, avec une température d'hybridation optimale respective de 60.74 ° C et 61.12 ° C, ainsi la teneur en GC est de 60.00% et 55.00%, extrêmement spécifique de la séquence. Tous ces éléments sont répertoriés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 3.1. La compatibilité de notre amorce avec les conditions d'une bonne amorce :

Les conditions	La bonne amorce	Notre amorce
Produit spécifique	Moins de 1000 pb	821 pb
Produit aspécifique	Plus de 1000 pb	Tous plus de 1000 pb
Longueur d'amorce	Entre 18 et 24 nucléotides	Amorce sens : 20 nucléotides Amorce anti-sens : 20 nucléotides
Température de fusion	Entre 50 C et 62 ° C	Amorce sens : 60.74 ° C Amorce anti-sens : 61.12 ° C
Teneur en GC	Entre 40 et 60%.	Amorce sens : 60.00% Amorce anti-sens : 55.00%

3.3. Confirmation des résultats :

Nous avons soumis nos résultats à une confirmation en utilisant le site « <https://genome.ucsc.edu/> », mais également le programme « PCR In Silico » un autre outil de bio-informatique utilisé pour simuler la PCR d'une paire d'amorces à confirmer.

Chapitre 3. Résultats

Après avoir entré l'amorce sens et l'amorce anti-sens, les résultats ont donné le produit situé sur le chromosome 6. Par conséquent, ces résultats nous confirment la spécificité, la fiabilité et la validité de la paire d'amorces du gène *IRF4* que nous avons conçu.

The screenshot displays the UCSC In-Silico PCR tool interface. At the top, there is a navigation bar with links for Genomes, Genome Browser, Tools, Mirrors, Downloads, My Data, Projects, Help, and About Us. The main section is titled "UCSC In-Silico PCR" and contains several input fields: "Genome:" set to "Human", "Assembly:" set to "Dec. 2013 (GRCh38/hg38)", "Target:" set to "genome assembly", "Forward Primer:" set to "GGTGCGTTACAGGAGAGCAI", and "Reverse Primer:" set to "AAACCCCTCAAGCCTTTGGC". There is also a "submit" button. Below these fields are "Max Product Size:" (4000), "Min Perfect Match:" (15), "Min Good Match:" (15), and a "Flip Reverse Primer:" checkbox. A section titled "About In-Silico PCR" explains the search process and provides configuration options for Genome and Assembly, Target, Forward Primer, Reverse Primer, Max Product Size, Min Perfect Match, Min Good Match, and Flip Reverse Primer. The "Output" section shows a sample FASTA sequence for human chromosome 6. Below this, there is a section for "Primer Melting Temperatures" with values for Forward (61.0 C) and Reverse (64.7 C) primers. A "Help" section at the bottom provides links for "What is chr_alt & chr_fix?" and "Replicating in-Silico PCR results on local machine".

Figure 3.2. Les résultats de « PCR In Silico ».

CHAPITRE 4

Conclusion

CHAPITRE 4

Conclusion

Un nouveau sous-type de lymphocytes CD4+ appelé cellules Th9 sécrétant spécifiquement l'interleukine IL-9 a été impliquées à la fois dans la bonne santé et la maladie. Les études primaires sur ces cellules Th9 se sont essentiellement concentrées sur les facteurs de transcription de l'IL-9 et leurs influences sur le système immunitaire, le plus important d'entre eux c'est l'IRF4 qui est requis pour contribuer de manière cruciale au développement et au fonctionnement des cellules Th9 via sa liaison au locus *IL9*.

L'amplification par PCR du gène *IRF4* pour l'étude moléculaire de la séquence IRF4 est nécessaire pour obtenir des informations concernant l'association de certains polymorphismes aux maladies du système immunitaire. Pour cela il existe un besoin urgent de concevoir des amorces spécifiques nécessaires à obtenir un bon produit d'amplification.

A l'aide de l'outil de conception des amorces Primer-BLAST de la base de données « NCBI » nous avons pu obtenir notre paire d'amorces du gène IRF4 pour la PCR qui va générer d'énormes avantages dans diverses études d'analyse de la séquence de ce gène.

La paire d'amorces que nous avons obtenues donne un produit d'amplification d'une longueur de 20 nucléotides pour chaque amorce, une température d'hybridation de 60.74 ° C , 61.12 ° C, et la teneur en GC 60.00%, 55.00%, respectivement pour l'amorce sens et l'amorce anti-sens.

CHAPITRE 5

Bibliographie

CHAPITRE 5

Bibliographie

A

Abdelaziz, M., Wang, H., Cheng, J., and Xu, H. (2020). Th2 cells as an intermediate for the differentiation of naïve T cells into Th9 cells, associated with the Smad3/Smad4 and IRF4 pathway. *Exp. Ther. Med.*

Adamaki, M., Lambrou, G.I., Athanasiadou, A., Tzanoudaki, M., Vlahopoulos, S., and Moschovi, M. (2013). Implication of IRF4 Aberrant Gene Expression in the Acute Leukemias of Childhood. *PLoS ONE* 8, e72326.

Afshar-Ghasemlou, S., Esmaeil, N., Sherkat, R., Yazdani, R., Abbasi-Rad, F., Ganjalikhani-Hakemi, M., and Rezaei, A. (2019). Increased IRF4 expression in isolated B cells from common variable immunodeficiency (CVID) patients. *Allergol. Immunopathol. (Madr.)* 47, 52–59.

Agnarelli, A., Chevassut, T., and Mancini, E.J. (2018). IRF4 in multiple myeloma—Biology, disease and therapeutic target. *Leuk. Res.* 72, 52–58.

Angkasekwinai, P. (2017). Allergic Inflammation and Atopic Disease: Role of Th9 Cells. In *Th9 Cells*, R. Goswami, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 189–199.

Angkasekwinai, P. (2019). Th9 Cells in Allergic Disease. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 19, 29.

Anuradha, R., Munisankar, S., Bhootra, Y., Jagannathan, J., Dolla, C., Kumaran, P., Nutman, T.B., and Babu, S. (2016). IL-10- and TGF β -mediated Th9 Responses in a Human Helminth Infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004317.

Asslaber, D., Qi, Y., Maeding, N., Steiner, M., Denk, U., Höpner, J.P., Hartmann, T.N., Zaborsky, N., Greil, R., and Egle, A. (2019). B-cell-specific IRF4 deletion accelerates chronic lymphocytic leukemia development by enhanced tumor immune evasion. *Blood* 134, 1717–1729.

B

Baeck, M., Herman, A., de Montjoye, L., Hendrickx, E., Chéou, P., Cochez, P.M., and Dumoutier, L. (2018). Increased expression of interleukin-9 in patients with allergic contact dermatitis caused by *p*-phenylenediamine. *Contact Dermatitis* 79, 346–355.

Basu, C. (2015). Preface. PCR primer design. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 1275, vii.

Biassoni, R., and Raso, A. (2020). *Quantitative real-time PCR: methods and protocols.*

Bustin, S., and Huggett, J. (2017). qPCR primer design revisited. *Biomol. Detect. Quantif.* 14, 19–28.

C

Chakraborty, S., Kubatzky, K.F., and Mitra, D.K. (2019). An Update on Interleukin-9: From Its Cellular Source and Signal Transduction to Its Role in Immunopathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2113.

Chen, J., Guan, L., Tang, L., Liu, S., Zhou, Y., Chen, C., He, Z., and Xu, L. (2019). T Helper 9 Cells: A New Player in Immune-Related Diseases. *DNA Cell Biol.* 38, 1040–1047.

Cherian, M.A., Olson, S., Sundaramoorthi, H., Cates, K., Cheng, X., Harding, J., Martens, A., Challen, G.A., Tyagi, M., Ratner, L., et al. (2018). An activating mutation of interferon regulatory factor 4 (IRF4) in adult T-cell leukemia. *J. Biol. Chem.* 293, 6844–6858.

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

Clark, R.A., and Schlapbach, C. (2017). TH9 cells in skin disorders. *Semin. Immunopathol.* 39, 47–54.

D

Deng, Y., Wang, Z., Chang, C., Lu, L., Lau, C.S., and Lu, Q. (2017). Th9 cells and IL-9 in autoimmune disorders: Pathogenesis and therapeutic potentials. *Hum. Immunol.* 78, 120–128.

E

Elyaman, W., and Khoury, S.J. (2017). Th9 cells in the pathogenesis of EAE and multiple sclerosis. *Semin. Immunopathol.* 39, 79–87.

G

Garibyan, L., and Avashia, N. (2013). Polymerase Chain Reaction. *J. Invest. Dermatol.* *133*, 1–4.

Goswami, R. (2017). Th9 Cells: New Member of T Helper Cell Family. In *Th9 Cells*, R. Goswami, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 1–19.

Green, M.R., and Sambrook, J. (2018). The Basic Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb. Protoc.* *2018*, pdb.prot095117.

H

Hendling, M., and Barišić, I. (2019). In-silico Design of DNA Oligonucleotides: Challenges and Approaches. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* *17*, 1056–1065.

Hendling, M., Pabinger, S., Peters, K., Wolff, N., Conzemius, R., and Barišić, I. (2018). Oli2go: an automated multiplex oligonucleotide design tool. *Nucleic Acids Res.* *46*, W252–W256.

Huber, M., and Lohoff, M. (2014). IRF4 at the crossroads of effector T-cell fate decision: Highlights. *Eur. J. Immunol.* *44*, 1886–1895.

Hung, J.-H., and Weng, Z. (2016). Designing Polymerase Chain Reaction Primers Using Primer3Plus. *Cold Spring Harb. Protoc.* *2016*, pdb.prot093096.

K

Kaplan, M.H. (2017). The transcription factor network in Th9 cells. *Semin. Immunopathol.* *39*, 11–20.

Kaplan, M.H., Hufford, M.M., and Olson, M.R. (2015). The development and in vivo function of T helper 9 cells. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 295–307.

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.

L

Li, M., Yu, H., Wang, Y., Qin, L., and Sun, W. (2019). Role of IRF4 in the Protection of Metformin-Mediated Sepsis Myocarditis. *Dose-Response* *17*, 155932581982743.

Chapitre 5. Bibliographie

Li, Y., Yu, Q., Zhang, Z., Wang, J., Li, S., Zhang, J., and Liu, G. (2016a). TH9 cell differentiation, transcriptional control and function in inflammation, autoimmune diseases and cancer. *Oncotarget* 7, 71001–71012.

Li, Y., Yu, Q., Zhang, Z., Wang, J., Li, S., Zhang, J., and Liu, G. (2016b). T_H9 cell differentiation, transcriptional control and function in inflammation, autoimmune diseases and cancer. *Oncotarget* 7.

Licona-Limón, P., Arias-Rojas, A., and Olgúin-Martínez, E. (2017). IL-9 and Th9 in parasite immunity. *Semin. Immunopathol.* 39, 29–38.

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

Ma, X. (2016). Regulation of cytokine gene expression in immunity and diseases.

M

Malik, S., Dardalhon, V., and Awasthi, A. (2017). Characterization of Th9 Cells in the Development of EAE and IBD. In *Th9 Cells*, R. Goswami, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 201–216.

Mannino, M.H., Zhu, Z., Xiao, H., Bai, Q., Wakefield, M.R., and Fang, Y. (2015). The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer Lett.* 367, 103–107.

Marx, V. (2016). PCR: the price of infidelity. *Nat. Methods* 13, 475–479.

Mollazadeh, H., Cicero, A.F.G., Blesso, C.N., Pirro, M., Majeed, M., and Sahebkar, A. (2019). Immune modulation by curcumin: The role of interleukin-10. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 59, 89–101.

N

Nam, S., and Lim, J.-S. (2016). Essential role of interferon regulatory factor 4 (IRF4) in immune cell development. *Arch. Pharm. Res.* 39, 1548–1555.

Nam, S., Kang, K., Cha, J.S., Kim, J.W., Lee, H.G., Kim, Y., Yang, Y., Lee, M.-S., and Lim, J.-S. (2016). Interferon regulatory factor 4 (IRF4) controls myeloid-derived suppressor cell (MDSC) differentiation and function. *J. Leukoc. Biol.* 100, 1273–1284.

Neurath, M.F., and Kaplan, M.H. (2017). Th9 cells in immunity and immunopathological diseases. *Semin. Immunopathol.* 39, 1–4.

O

Ortmann, C.A. (2005). Down-regulation of interferon regulatory factor 4 gene expression in leukemic cells due to hypermethylation of CpG motifs in the promoter region. *Nucleic Acids Res.* 33, 6895–6905.

P

Pan, H.-F., Leng, R.-X., Li, X.-P., Zheng, S.G., and Ye, D.-Q. (2013). Targeting T-helper 9 cells and interleukin-9 in autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 24, 515–522.

Qian, Y., Du, Z., Xing, Y., Zhou, T., Chen, T., and Shi, M. (2017). Interferon regulatory factor 4 (IRF4) is overexpressed in human non-small cell lung cancer (NSCLC) and activates the Notch signaling pathway. *Mol. Med. Rep.* 16, 6034–6040.

Q

Qu, W., and Zhang, C. (2015). Selecting Specific PCR Primers with MFEprimer. In *PCR Primer Design*, C. Basu, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 201–213.

R

Remesh, S.G., Santosh, V., and Escalante, C.R. (2015). Structural Studies of IRF4 Reveal a Flexible Autoinhibitory Region and a Compact Linker Domain. *J. Biol. Chem.* 290, 27779–27790.

Rivera Vargas, T., Humblin, E., Végran, F., Ghiringhelli, F., and Apetoh, L. (2017). TH9 cells in anti-tumor immunity. *Semin. Immunopathol.* 39, 39–46.

Rodríguez, A., Rodríguez, M., Córdoba, J.J., and Andrade, M.J. (2015). Design of Primers and Probes for Quantitative Real-Time PCR Methods. In *PCR Primer Design*, C. Basu, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 31–56.

S

Sanjabi, S., Oh, S.A., and Li, M.O. (2017). Regulation of the Immune Response by TGF- β : From Conception to Autoimmunity and Infection. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9, a022236.

Schaper-Gerhardt, K., Wohler, M., Mommert, S., Kietzmann, M., Werfel, T., and Gutzmer, R. (2020). Stimulation of histamine H₄ receptors increases the production of IL-9 in Th9 polarized cells. *Br. J. Pharmacol.* 177, 614–622.

Chapitre 5. Bibliographie

Schmitt, E., Klein, M., and Bopp, T. (2014). Th9 cells, new players in adaptive immunity. *Trends Immunol.* 35, 61–68.

Shohan, M., Sabzevary-Ghahfarokhi, M., Bagheri, N., Shirzad, H., Rahimian, G., Soltani, A., Ghatreh-Samani, M., Deris, F., Tahmasbi, K., Shahverdi, E., et al. (2018). Intensified Th9 Response is Associated with the Immunopathogenesis of Active Ulcerative Colitis. *Immunol. Invest.* 47, 700–711.

Shukla, V., and Lu, R. (2014). IRF4 (interferon regulatory factor 4). *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.*

Singh, T.P., Schön, M.P., Wallbrecht, K., Gruber-Wackernagel, A., Wang, X.-J., and Wolf, P. (2013). Involvement of IL-9 in Th17-Associated Inflammation and Angiogenesis of Psoriasis. *PLoS ONE* 8, e51752.

T

Tamiya, T., Ichiyama, K., Kotani, H., Fukaya, T., Sekiya, T., Shichita, T., Honma, K., Yui, K., Matsuyama, T., Nakao, T., et al. (2013). Smad2/3 and IRF4 Play a Cooperative Role in IL-9–Producing T Cell Induction. *J. Immunol.* 191, 2360–2371.

Tang, M., Cheng, L., Li, F., Wu, B., Chen, P., Zhan, Y., Hua, F., Min, Z., Ke, Y., Liu, C., et al. (2019). Transcription Factor IRF4 Dysfunction Affects the Immunosuppressive Function of Treg Cells in Patients with Primary Immune Thrombocytopenia. *BioMed Res. Int.* 2019, 1–11.

Tang, T., Lu, Q., Yang, X., Liu, X., Liao, R., Zhang, Y., and Yang, Z. (2015). Roles of the tacrolimus-dependent transcription factor IRF4 in acute rejection after liver transplantation. *Int. Immunopharmacol.* 28, 257–263.

V

Vegran, F., Martin, F., Apetoh, L., and Ghiringhelli, F. (2016). Les lymphocytes Th9: Une nouvelle population de lymphocytes T auxiliaires dans la lutte contre le cancer. *Médecine/Sciences* 32, 387–393.

Visser, M., Palstra, R.-J., and Kayser, M. (2015). Allele-specific transcriptional regulation of IRF4 in melanocytes is mediated by chromatin looping of the intronic rs12203592 enhancer to the IRF4 promoter. *Hum. Mol. Genet.* 24, 2649–2661.

Chapitre 5. Bibliographie

Vyas, S.P., Hansda, A.K., Kaplan, M.H., and Goswami, R. (2020). Calcitriol Regulates the Differentiation of IL-9–Secreting Th9 Cells by Modulating the Transcription Factor PU.1. *J. Immunol.* 204, 1201–1213.

W

Wang, S., Yan, Q., Chen, P., Zhao, P., and Gu, A. (2014). Association of interferon regulatory factor 4 gene polymorphisms rs12203592 and rs872071 with skin cancer and haematological malignancies susceptibility: a meta-analysis of 19 case–control studies. *BMC Cancer* 14, 410.

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.

Wu, J., Zhang, H., Shi, X., Xiao, X., Fan, Y., Minze, L.J., Wang, J., Ghobrial, R.M., Xia, J., Sciammas, R., et al. (2017). Ablation of Transcription Factor IRF4 Promotes Transplant Acceptance by Driving Allogenic CD4+ T Cell Dysfunction. *Immunity* 47, 1114-1128.e6.

Y

Yao, S., Buzo, B.F., Pham, D., Jiang, L., Taparowsky, E.J., Kaplan, M.H., and Sun, J. (2013). Interferon Regulatory Factor 4 Sustains CD8+ T Cell Expansion and Effector Differentiation. *Immunity* 39, 833–845.

Yao, X., Zhao, J., Kong, Q., Xie, X., Wang, J., Sun, B., Xu, L., Mu, L., and Li, H. (2018). Exogenous IL-9 Ameliorates Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis Symptoms in Rats. *Immunol. Invest.* 47, 712–724.

Z

Zhang, Y., Jia, X., Xia, Y., Li, H., Chen, F., Zhu, J., Zhang, X., Zhang, Y., Wang, Y., Xu, Y., et al. (2018). Altered expression of transcription factors IRF4 and IRF8 in peripheral blood B cells is associated with clinical severity and circulating plasma cells frequency in patients with myasthenia gravis. *Autoimmunity* 51, 126–134.

Zheng, N., and Lu, Y. (2020). Targeting the IL-9 pathway in cancer immunotherapy. *Hum. Vaccines Immunother.* 1–8.