

UNIVERSITE de TLEMCCEN
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 **W0414100**

MEMOIRE

Présenté par

BENZOZOU Abir Nessrine

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Immunologie

Thème

STAT-6 et profil anti- inflammatoire du macrophage M2

Sous la direction du professeur Mourad ARIBI

Soutenu le 20/09/2020,

devant le jury :

Dr MC Smahi	Maitre de conférence A	Université de Tlemcen	Présidente
Dr Mourad ARIBI	Professeur	Université de Tlemcen	Dir. de thèse
Dr Nabila Brahami	Maitre de conférence A	Université de Tlemcen	Examinatrice

sept.-2020

UNIVERSITE de TLEMCCEN
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 **W0414100**

MEMOIRE

Présenté par

BENZOZOU Abir Nessrine

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Immunologie

Thème

STAT-6 et profil anti- inflammatoire du macrophage M2

Sous la direction du professeur Mourad ARIBI

Soutenu le 20/09/2020,

devant le jury :

Dr MC Smahi	Maitre de conférence A	Université de Tlemcen	Présidente
Dr Mourad ARIBI	Professeur	Université de Tlemcen	Dir. de thèse
Dr Nabila Brahami	Maitre de conférence A	Université de Tlemcen	Examinatrice

sept.-2020

Résumé

Introduction : Le macrophage est une cellule du système immunitaire d'origine hématopoïétique qui joue un rôle crucial dans l'immunité innée, la protection contre différents pathogènes ainsi que l'homéostasie des tissus. Ils adoptent un états d'activation présentés par deux sous-types, M1 pro-inflammatoire et M2 anti-inflammatoire, acquis par l'activation de différentes voies de signalisation notamment la voie STAT6. L'étude de leur expression au cours des pathologies permet de faciliter la caractérisation de ces cellules.

Objectif : concevoir des amorces de gène *STAT-6* qui a été associée à certains maladie pour la réalisation d'une PCR.

Matériels et méthode : La conception de bonnes paires d'amorces passe par plusieurs étapes. D'abord, la séquence du gène *STAT6* a été prise à partir du site ENSEMBL. Ensuite, À travers le centre national de l'information biotechnologique (NCBI) et par l'utilisation de l'outil Primer Blast, les amorces spécifiques au gène *STAT6* ont été conçues. Enfin, la paire d'amorces choisie et qui répond aux critères de choix de bonnes amorces a été vérifié par -PCR in silico.

Résultats : Parmi les 10 paires d'amorces spécifiques du gène *STAT6* obtenues, nous avons choisi la huitième paire d'amorces car elle répond aux critères de bonnes amorces.

Conclusion : Concevoir une bonne paire d'amorce aide à réussir la technique PCR, et donc l'amplification correcte du gène *STAT6* et l'étude de son rôle dans certain maladies anti-inflammatoires .

Mots clés : Macrophage , *STAT-6* , anti-inflammation , polymorphisme, conception d'amorce

Abstract

Background: The macrophage is an immune system cell of hematopoietic origin that plays a crucial role in innate immunity, protection against various pathogens as well as tissue homeostasis. They adopt an activation state presented by two subtypes, pro-inflammatory M1 and anti-inflammatory M2, acquired by the activation of different signaling pathways, in particular the STAT6 pathway. The study of their expression during pathologies makes it possible to facilitate the characterization of these cells.

Objective: to design STAT-6 gene primers which has been associated with certain diseases for the performance of PCR.

Materials and Method: There are several steps to designing good primer pairs. First, the sequence of the STAT6 gene was taken from the ENSEMBL site. Then, through the National Biotechnology Information Center (NCBI) and through the use of the Primer Blast tool, primers specific to the STAT6 gene were designed. Finally, the pair of primers chosen and which meets the criteria for choosing good primers was verified by -PCR in silico.

Results: Among the 10 pairs of primers specific for the STAT6 gene obtained, we chose the eighth pair of primers because it meets the criteria for good primers.

Conclusion: Designing a good primer pair helps to achieve the PCR technique, and therefore the correct amplification of the STAT6 gene and the study of its role in certain anti-inflammatory diseases.

Keywords: Macrophage, STAT-6, anti-inflammation, polymorphism, primer design

ملخص

مقدمة: البلاعم هي خلية جهاز مناعة من أصل مكون للدم وتلعب دورًا حاسمًا في المناعة الفطرية ، والحماية من مسببات الأمراض المختلفة وكذلك توازن الأنسجة. تتبنى حالة تنشيط مقدمة من نوعين فرعيين ، M1 المؤيد للالتهابات و M2 المضاد للالتهابات ، المكتسبة عن طريق تنشيط مسارات الإشارات المختلفة ، ولا سيما مسار STAT6. نتيج دراسة تعبيرها أثناء الأمراض تسهيل توصيف هذه الخلايا.

الهدف: تصميم البادئات الجينية STAT-6 التي ارتبطت بأمراض معينة من أجل أداء تفاعل البوليميراز المتسلسل

المواد والطريقة: هناك عدة خطوات لتصميم أزواج برايمر جيدة. أولاً ، تم أخذ تسلسل الجين STAT6 من موقع ENSEMBL. بعد ذلك ، من خلال المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI) ومن خلال استخدام أداة Primer Blast ، تم تصميم مواد أولية خاصة بجين STAT6. أخيرًا ، تم التحقق من زوج البادئات والذي يفي بمعايير اختيار البادئات الجيدة المختارة بواسطة PCR- في السيليكو.

النتائج: من بين 10 أزواج من البادئات الخاصة بجين STAT6 التي تم الحصول عليها ، اخترنا الزوج الثامن من البادئات لأنه يفي بمعايير البادئات الجيدة.

الخلاصة: تصميم زوج تمهيدي جيد يساعد في تحقيق تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل ، وبالتالي التضخيم الصحيح لجين STAT6 ودراسة دوره في بعض الأمراض المضادة للالتهابات.

الكلمات المفتاحية : Macrophage، STAT-6 ، مضاد للالتهابات ، تعدد الأشكال ، تصميم أول

Avant-propos

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

Je remercie tout particulièrement mon Professeur Mourad ARIBI; pour la confiance qu'il m'a accordé en acceptant d'encadrer ce travail. pour sa patience, ses encouragements, et sa disponibilité. Ses conseils, ses commentaires, ses corrections et ses qualités scientifiques Enfin, j'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines, à sa rigueur, et à son professionnalisme. Je suis infiniment heureuse et honorée d'avoir réaliser ce travail sous sa direction.

Je remercie également Dr. Wafa NOUARI, maitre de conférence, université de Tlemcen d'avoir partagé avec nous ca passion pour l'enseignement, mais aussi son soutien, ces conseils et son expérience tout au long de l'année.

Un grand merci à tous les membres du Laboratoire et plus particulièrement: Zineb HADJIDJ, Rabiaa MESSALI , ainsi que toute la promotion master 2 immunologie 2019/2020. pour la très bonne ambiance durant ces deux ans d'études, vous m'avez énormément apporté, et chacun d'entre vous a laissé une trace en moi et j'espère que j'ai pu faire pareil pour vous.

Finalement, j'exprime toute ma gratitude au membre de jury pour leurs présence et l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Je dédie ce travail à :

*Mes chers parents et mon Grand-père, sans qui, je ne serais rien aujourd'hui et qui m'ont toujours soutenu, j'espère que
votre
bénédition m'accompagne toujours.*

*Ma Chère sœur DOUAA et mon frère AYMEN, je vous remercie pour m'avoir fait partager la joie de vivre et m'avoir ainsi
soutenu dans mes efforts et m'encourager.*

*A ma très chère copine : Yasmine SEDJAI ma sœur je te remercie pour ton encouragement, ta présence et pour les bons
moments inoubliables qu'on a passé ensemble durant notre cursus.*

Toute personne qui m'a aidé Merci infiniment.

TABLE DES MATIERES

Résumé	iii
Abstract	iv
Résumé en arabe	v
Avant propos	vi
Table des matières	vii
Liste des figures	x
Liste des tableaux	xi
Liste des abréviation	xii
Introduction	1
Chapitre 1. revue de la littérature	
1. Cellules souche hématopoïétiques CSH	2
1.1. Origine	2
	2
1.2. Macrophage	
1.2.1. définitions	2
1.2.2. fonctions	3
1.2.3. polarisations	4
1.2.3.1 macrophage classiquement activé M1	5
1.2.3.2. macrophage alternativement activé M2	5
	6
1.3. M2 et profil anti-inflammatoire	
1.3.1. M2 Murin	6
1.3.2. M2 humain	6
1.3.3. macrophage alternativement activé et pathologies	8
1.4. STAT6	9
1.4.1. généralités : famille des STAT	9
1.4.2. voies de signalisation de la polarisations M2	10
1.4.2.1. la voie JAK-STAT	10
1.4.3. Gène STAT 6	10

1.4.4. structure protéique de STAT6	11
1.4.5. rôle de STAT 6	12
1.4.6. protéine STAT6 et macrophage M2	13
1.4.7. variantes SNPs du gène STAT6 associé au profil anti-inflammatoire des macrophages M2	14
1.5. Polymerase Chain Reaction	15
1.5.1 .définitions et principe	15
1.6. problématique et objectifs	16
Chapitre 2. Matériels et méthode	
2.1. conception d'amorce	19
Chapitre 3. Résultats	
3.1. Résultats de la conception des amorces	20
3.1. confirmations des résultats	21
Chapitre 4. Discussion	23
Chapitre 5. Conclusions et perspectives	24
Chapitre 6. Bibliographie	25

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Origine des macrophages	2
Figure 1.2. Polarisation des macrophages M1 et M2	4
Figure 1.3. Gène STAT6 dans un emplacement génomique	10
Figure 1.4. Schéma de dessin du complexe STAT6 (en vue de face)	11
Figure 1.5. Structure protéique de STAT6 .	11
Figure 1.6. Rôle de STAT6	12
Figure 1.7. Activation et phosphorylation de STAT6	13
Figure 1.8. Principe de la PCR	16
Figure 2.1. les étapes d'une conception d'amorce par le Primer BLAST	18
figure 3.1. Résultats de primer BLAST	20
Figure 3.2. Résultats de confirmation par le site UCSC in silico PCR	21

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Molécules marqueurs des macrophages M2	4
Tableau 1.2. Marqueurs des macrophages M2 murin et humain	6

Listes des abréviations**A**

Arg1 : arginase 1

AA : acide aminé

ADN : acide désoxyribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

B

BALF : Broncho Alveolar Lavage Fluid

BCL2 : lymphome à cellules B 2

BCL-XL : lymphome à cellules B extra-large

C

CSH : cellule souche hématopoïétique

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CI : complexe immun

Myc : Proto-oncogène MYC

CCD : domaine de bobine enroulée N-terminal

D

DBD : domaine de liaison à l'ADN

dNTP : Désoxynucléotides triphosphates

E

Egr2 : Early growth response protein 2

F

Fizz1 : found in inflammatory zone 1

H

HLA –DR : Human Leukocyte Antigen – DR isotype

I

iNOS : inductible nitric oxide synthase

IFN : Interferon

IL : Interleukine

IL-4R : récepteur de IL-4

IL-13R: récepteur de IL-13

IgE : Immunoglobuline E

J

JAK : les kinases Janus

M

M1 : macrophage classiquement activé/ pro inflammatoire

M2 : macrophage alternativement activé/réparateur

MPP : métalloprotéases pro-fibrotique

MGL : Monoacylglycerol lipase

MDSC : myeloid derived suppressor cell

N

NO : monoxyde d'azote

NOS: NO synthase

P

Pb : pair de base

PCR : Polymerase Chain Reaction

S

SH2 : Src Homology 2

STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription

Src :

SNPs : polymorphismes mononucléotidique

T

TNF : tumor necrosis factor

TLR : Toll-Like Receptor

Th1: lymphocyte T helper de type 1

Th2: lymphocyte T helper de type 2

TF : Factor of transcription

TAM : Les macrophages associés aux tumeurs

TME : microenvironnement tumoral

U

UTR : UnTranslated Region

Y

Ym1 : molécule de type chitinase

Y641 : résidu tyrosine

Introduction

Introduction

Les macrophages sont des éléments essentiels du système immunitaire inné. Une fois que est activés par des molécules associées à des agents pathogènes, ou divers signaux et médiateurs du système immunitaire, ils adopter des états d'activation uniques. Ces états d'activation conceptualisé par le modèle dit de polarisation M1 / M2 qui peuvent avoir des effets pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires qui comprennent la destruction des agents pathogènes, l'élimination des cellules ou des tissus apoptotiques, et la cicatrisation tissulaire (Shapouri-Moghaddam et *al.*, 2018).

Les phénotypes M1 et M2 sont acquis par l'activation de différentes voies de signalisation notamment la voie STAT6, qui est une clé nœud de signalisation pour l'activation M2 des macrophages . Et donc lors de la Liaison de l'IL-4 et de l'IL-13 à leurs récepteurs correspondants conduit à l'activation de Janus kinase (JAK). Ce dernier provoque la phosphorylation des résidus de tyrosine sur le récepteur (IL-4R α) et le récepteur (IL-13R α). STAT6 est ensuite recruté pour le récepteur phosphorylé par l'homologie Src 2 (SH2) domaine, qui permet à (Tyr641) de phosphoryler STAT6 suivi de sa dimérisation. A la suite STAT6 activé s'accumule dans le noyau des cellules répondeuses et induit la transcription des gènes (Waqas et *al.*, 2019) .

Les macrophages ont diverses fonctions qui ont un impact sur la santé. Par exemple, les macrophages M2 sont importants dans les plaies la guérison et la réparation des tissus, et peut également réduire l'inflammation dans les tissus métaboliquement actifs dans les maladies métaboliques telles que le diabète et obésité. Cependant, les macrophages M2 peuvent avoir des effets dans certaines maladies, par exemple, elles contribuent à la croissance tumorale et la fibrose. C'est le résultat d'une mutation au sein d'un gène donné et que peut être le gène *STAT6* (Wynn and Vannella, 2016).

Plusieurs études se sont intéressées à l'analyse des SNP *STAT6*, qu'ont été associés à une allergie alimentaire, asthme, et IgE totales (Lim et *al.*, 2013). Il existe plusieurs SNP validés et répertoriés dans la liste de données dbSNP, Parmi les SNP les plus étudiés chez l'homme : rs3024974, rs71802646, rs2598483.

Aussi, l'étude de l'expression de la voie de signalisation *STAT6* s'est avérée cruciale dans la mis en évidence d'importante anomalies de la réponse immunitaire impliquant un défaut ou une forte polarisation vers les macrophages M2.

Introduction

Dans ce contexte l'objectif spécifique de ce travail de master a été axé sur la conception des amorces du gène STAT6

Chapitre 1. Revue de littérature

1. Cellules souche hématopoïétiques CSH

1.1. Origine des macrophages

Le développement hématopoïétique se produit dans au moins trois vagues différent . Les macrophages sont générés dans les trois vagues, d'abord dans le sac vitellin, puis dans la deuxième vague à partir de progéniteurs érythro-myéloïdes (EMP), et enfin à partir de monocytes dérivés de CSH (Mariani et al., 2019) .

Ces derniers sortent de la moelle osseuse et entrent dans la circulation sanguine et ne restent dans le sang que deux à trois jours ; ils migrent vers les tissus où ils acquièrent des caractéristiques morphologiques, cytochimiques et fonctionnelles pour donner naissance à des macrophages spécifiques de chaque tissu avec une durée de vie plus longue (Mosser and Edwards, 2008a) .

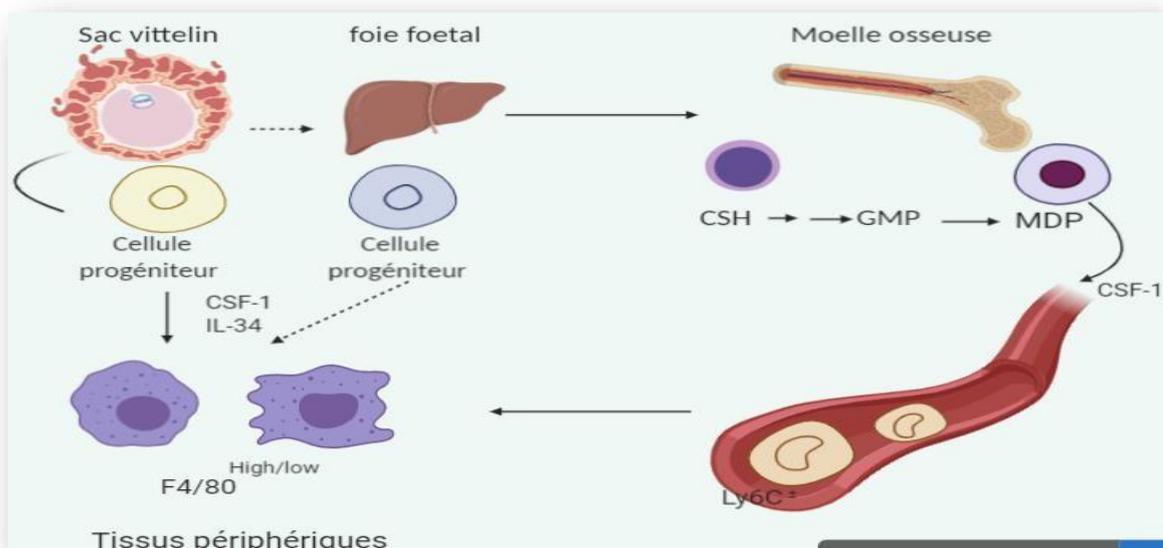


Figure 1.1. Origines des macrophages . les macrophages proviennent de trois sources .le premier est le sac vitellin dans l'embryon , puis déplace vers le foie foetal .la troisième source est la moelle osseuse qui donne naissance a des monocytes .

1.2. Macrophage

1.2.1. Définition

Le macrophage est considéré comme un composant cellulaire clé de l'immunité innée, premières cellules immunitaires à apparaître dans le développement d'un organisme, agissant comme le principal acteur de la défense de première ligne

Chapitre 1. Revue de littérature

contre les agents pathogènes et modulant les réponses homéostatiques et inflammatoires (Parisi et *al.*, 2018).

Il appartient au système mononucléaire des phagocytes, une famille de phagocytes professionnels qui implique aussi les cellules monocytes et dendritiques (Parisi et *al.*, 2018).

En 1882, Élie Metchnikoff a inventé le terme macrophage (vient du grec et qui signifie «gros mangeurs»). Il a été aussi le premier à décrire l'ingestion par les macrophages de particules ou de cellules, appelée phagocytose, comme réponse immunitaire protectrice (Frodermann and Nahrendorf, 2018).

1.2.2. Fonctions

Dans des conditions normales ou pathologiques, les macrophages assurent diverses fonctions dans un organisme par rapport à leur emplacement. y compris la phagocytose des agents pathogènes, infectés, débris et cellules mortes, la présentation Antigénique dépend du complexe majeur d'histocompatibilité CMH, la Production de différents types de cytokines, dont l'interleukine-1 (IL-1), TNF- α etc... Mais aussi il contribue à la régénération tissulaire, et le maintien d'un équilibre nécessaire au fonctionnement du microbiote ; De plus, ils jouent un rôle très important dans la progression des maladies inflammatoires, notamment l'athérosclérose (Shapouri-Moghaddam et *al.*, 2018 ; de Sousa et *al.*, 2019 ; Czimmerer et *al.*, 2016).

En plus de ces rôles génériques, les macrophages assurent des fonctions spécifiques aux tissus. En citons par exemple, les populations résidentes dans les zones muqueuses entrent en contact avec des agents pathogènes environnementaux et les macrophages spléniques contrôlent le métabolisme du fer avec les cellules de Kupffer et les érythrocytes sénescents clairs de la circulation (Kapellos and Iqbal, 2016).

En conséquence, les macrophages sont nécessaires pour maintenir une réponse équilibrée aux signaux homéostatiques ou endommageant les tissus et, lorsque cet équilibre délicat est perturbé, une maladie inflammatoire peut s'installer (Lavin et *al.*, 2015).

Chapitre 1. Revue de littérature

1.2.3 Polarisations

La plasticité phénotypique est l'une des principales caractéristiques des macrophages, influençant leurs fonctions, et qu'est définis selon deux états d'activation principaux, appelés M1 classiquement activé et M2 alternativement activés. en réponse à des stimuli endogènes qui sont générés rapidement suivant la blessure ou l'infection (Parisi et *al.*, 2018).

Ces deux états d'activation, reflétant la polarisation Th1 – Th2 des cellules T, représente deux extrêmes d'un état dynamique. Les macrophages de type M1 sécrètent des cytokines qui inhibent la prolifération des cellules contigües et endommagent les tissus, tandis que le type M2 libèrent des cytokines qui favorisent la prolifération des cellules environnantes et la réparation des tissus (Wang et *al.*, 2014).

La signalisation canonique IRF / STAT est une voie centrale dans la modulation de la polarisation des macrophages, activé par différents types de cytokines, ont toutes été impliquées dans l'inclinaison des réponses des macrophages à un état ou à l'autre, conduisant à une expression génique médiée par FT (Kapellos and Iqbal, 2016).

L'exposition des macrophages M2 aux signaux M1, ou vice versa, peuvent induire une «re-polarisation» de macrophages différenciés est une autre preuve de leur plasticité fonctionnelle (Shapouri-Moghaddam et *al.*, 2018).

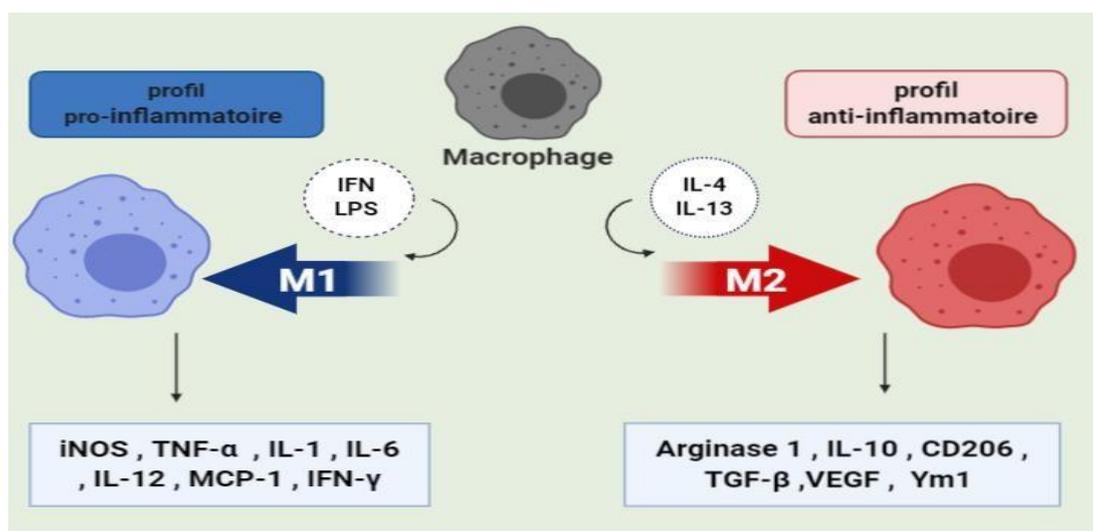


figure 1.2. Polarisation des macrophages M1 et M2 . la polarisation en profil pro-inflammatoire et anti-inflammatoire dépend des principaux stimulateurs.

Chapitre 1. Revue de littérature

1.2.3.1 Macrophage classiquement activé M1

L'activation dite « classique » conduit aux macrophages M1, induite par l'IFN- γ , associé à un stimulus microbien tel que les LPS ou à des cytokines comme le TNF- α ou le GM-CSF, qui assurent l'initiation et le maintien de l'inflammation, et ont un rôle majeur dans la résistance aux infections (Mosser and Edwards, 2008b). mais aussi à la production des quantités importants de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et TNF- α et de chimiokines, avec une forte activité microbicide et tumoricide (Koh et al., 2018).

Ce type de macrophages activés à polarisation classique sont caractérisés par la production d'oxyde nitrique (NO) en exprimant la NO synthase inductible (iNOS) et par la régulation positive des molécules associées à la présentation de l'antigène telles que HLA-DR et les molécules costimulatrices (Huang et al., 2016).

1.2.3.2 . Macrophage alternativement activé M2

La forme alternative des macrophages est un nom générique utilisé pour nombreuses formes de macrophages non activés de façon classique, initialement définie par l'induction par l'IL-4 des molécules de CMH II et du récepteur mannose à leurs surface. Actuellement l'activation alternative est définie comme l'activation des macrophages en réponse aux IL-4 et IL-13 (Martinez et al., 2009).

Les macrophages M2 sécrètent des grandes quantités de cytokines anti-inflammatoires (IL-10), des chimiokines telles que CCL17, CCL18, expriment des récepteurs du mannose et des récepteurs piègeurs et sont associés à des réponses anti-inflammatoires et de type Th2, à la cicatrisation des plaies et à la résolution de l'inflammation (Huang et al., 2016).

Tableau 1.1. Molécules marqueurs des macrophages M2

Molécules marqueurs M2	
Marqueurs de surface	CMH-II , CD86 , CD163 , IL-R α , CD206
Enzyme	Arg1 , Ym1 , Fizz1 , MMP12 , MERTK
Sécrétions	IL-10 , IL-6 , TGF- β , CCL-17 , CCL-22 , CCL-18 , VEGF

Chapitre 1. Revue de littérature

La classification des macrophages M2 en fonction des signaux inducteurs conduit à distinguer les macrophages M2a, M2b, M2c et M2d. Le sous-ensemble M2a pourrait être induit par IL-4 et IL-13, Le M2b pourrait être induit suite a une stimulation par des complexes immuns (CI), Et produisent à la fois des cytokines pro et anti-inflammatoires IL-10, et TNF- α . Le sous-ensemble M2c est induit par glucocorticoïdes. Enfin, le quatrième type de M2d, est induit par des agonistes TLR à travers le récepteur de l'adénosine (Shapouri-Moghaddam et *al.*, 2018).

L'arginase 1 (Arg1) est un marqueur important de l'activation alternative des macrophages, hydrolyse la L -arginine, produisant de l'urée et de la L –ornithine (Duque-Correa et *al.*, 2014).

1.3. M2 et profil anti-inflammatoire

1.3.1 . M2 Murin

Les macrophages M2 sont impliqués dans la cicatrisation des plaies par leurs propriétés anti-inflammatoires . Récemment, les macrophages M2 se sont révélés montrer un phénotype pro-fibrotique capable d'induire une fibrose et d'exacerber le processus allergique .

tandis que à l'inverse, la réduction des macrophages M2 prédispose les souris maigres au développement d'une résistance à l'insuline , impliquant un rôle critique pour la polarisation M2 des macrophages dans l'homéostasie métabolique (Lee et *al.*, 2015).

Dans les macrophages M2, la signalisation de l'IL-4 a été liée à l'expression des TF, Egr2 et c-Myc . Egr2 est un TF hautement conservé dont la carence entraîne une diminution de la masse osseuse. Egr2 était lié à c-Myc, un TF impliqué dans la progression du cycle cellulaire, l'apoptose et la transformation cellulaire. À son tour, c-Myc a été lié à IRF4 , un IRF connu pour favoriser la spécificité du gène M2. (Jablonski et *al.*, 2015).

1.3.2.M2 Humain

Malgré les connaissances émergentes issues des études sur la souris, il existe un besoin non satisfait de marqueurs de macrophages M2 humains.

Les marqueurs M2 prototypiques de souris ne sont pas applicables car il n'y a pas d'homologues humains de gènes particuliers (par exemple, Ym1 et Fizz1) De plus, l'accès au matériel humain ex vivo est médiocre(Martinez et *al.*, 2013).

Chapitre 1. Revue de littérature

Les macrophages M2 sont activés par les cytokines Th2 et ils sont caractérisés par l'expression de marqueurs phénotypiques spécifiques, principalement les récepteurs piègeurs-classe 1 A (CD204), le récepteur mannose-1 (CD206) et récepteur piègeur d'hémoglobine (CD163). Avec une capacités de production des cytokines et de chimiokines spécifiques, telles que (IL-10) et la chimiokines (CCL-22), les MMP et le TGFbeta1. La libération de ces molécules contribue à l'activation des myofibroblastes et au dépôt de composants de la matrice extracellulaire (Gordon and Martinez, 2010).

les cytokines telles que l'IL-4 / IL-13, l'IL-10 et le TGF- β contribueront à M2 ,des phénotypes anti-inflammatoires qui sont largement impliqués dans l'immunosuppression , angiogenèse et réparation tissulaire (Zizzo and Cohen, 2013).

Bien que les sous-ensembles de macrophages polarisés M1 et M2 murins soient relativement faciles à distinguer sur la base des profils d'expression génique combinatoire, l'identification de sous-ensembles équivalents chez l'homme a été plus difficile. Le problème fondamental est que les panels de marqueurs pour les sous-ensembles de macrophages humains générés in vitro n'existent pas ou ne peuvent pas être convenus (Murray and Wynn, 2011) .

Une approche pour résoudre ce problème consiste à éliminer les facteurs de transcription qui établissent un biais dans les phénotypes des macrophages. Par exemple, le facteur de régulation de l'interféron 5 (IRF5) semble être crucial pour l'expression du gène des macrophages M1 humains . Par conséquent, le profilage systématique de l'expression génique dans des macrophages humains déficients en IRF5 (ou dans d'autres populations de macrophages dans lesquels la polarisation est génétiquement fixée ou biaisée) stimulés avec différentes cytokines et agonistes TLR pourrait révéler des panels de gènes qui s'associent à des sous-ensembles polarisés (Murray and Wynn, 2011) .

Chapitre 1. Revue de littérature

Tableau 1.2. Marqueurs des macrophages M2 murin et humain

Marqueurs	Murin	Humain
Macrophages M2		
Arg1	+	
Fizz1	+	
IL-10	+	+
CD206	+	+
IL-1Ra	+	+
CD150		+

1.3.3. Macrophage alternativement activé et pathologies

Les macrophages présentent des rôles bénéfiques ou néfastes dans la maladie, selon leur statut d'activation et la nature de la pathologie. Le phénotype M2 assurent des fonctions anti-inflammatoires ou réparatrices. Cependant, comme les macrophages M1, une activité excessive ou incontrôlée des macrophages M2 peut également provoquer certaines maladies comme la fibrose ou l'asthme (Murray and Wynn, 2011).

Les macrophages M2 régulent plusieurs fonctions métaboliques via le récepteur γ (PPAR γ) en assurent une sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose, ce qui peut diminuer la progressions de l'obésité induite par l'alimentation et du diabète de type 2 . des études montrent qu'à mesure que l'obésité progresse, les macrophages associés au tissu adipeux changent leurs phénotype de type M2 à M1 activé de façon classique avec une puissante activité pro-inflammatoire (Murray and Wynn, 2011).

Les cellules M2 sont considérées comme les principaux macrophages de l'asthme allergique. Dernièrement, Girodet et ses collègues ont fourni des preuves à l'appui d'une contribution directe des macrophages M2 dans les réponses allergiques des voies respiratoires et la pathogenèse de l'asthme . En particulier, ils ont constaté que les macrophages M2 étaient significativement augmentés avec une expression plus élevée de MRC1 et de MHC-II dans les BALF de patients souffrant d'asthme par rapport à des sujets témoins sains .Ces données indiquent un rôle potentiellement important pour les macrophages M2 dans l'asthme (Saradna et *al.*, 2018).

Chapitre 1. Revue de littérature

Les macrophages associés aux tumeurs (TAM) l'un des composants majeur du microenvironnement tumoral (TME). Ils jouent un rôle dans la croissance tumorale, la dissémination métastatique et l'échec thérapeutique (Murray and Wynn, 2011).

Les TAM isolés de tumeurs solides et métastatiques ont un phénotype suppressif de type M2. Intervient dans la progression tumorale, avec un nombre croissant de tourmalines, MDSC et monocytes immatures . Ces observations sont également convenables avec les activités tumorigènes de l' IL-4 et l' IL-13, qui favorisent également la différenciation macrophagique (Biswas and Mantovani, 2010).

Au début de l'athérosclérose, Les macrophages M2 changent leur phénotype à un profil pro-inflammatoire(M1) affectés par le microenvironnement, conduit à la progression suivie de la plaque athérosclérotique. Lorsque le microenvironnement change, comme une altération du métabolisme du cholestérol ou un stress oxydatif, les macrophages M1 retournent à leur phénotype M2 d'origine qui induisent une régression de l'athérosclérose. sécréter des cytokines anti-inflammatoires, favorisant la réparation tissulaire et l'efférocytose efficace (Bi et al., 2019).

1.4. STAT6

1.4.1. Généralités : famille des STAT

Les STAT pour (signal transducer and activator of transcription) sont une famille de facteurs de transcription qui comporte 7 membres connus (STAT1 à STAT6 , y compris STAT5a et STAT5b). Comme leur nom l'indique, ces facteurs peuvent à la fois transmettent le signal des récepteurs vers le noyau mais aussi activer directement la transcription de gènes sans l'intervention de seconds messagers (Lim and Cao, 2006).

La découverte des STATs provient d'études sur la signalisation induite par certains types des cytokines particulièrement IFN α et β qui signalent via ces facteurs (Hill and Treisman, 1995).

Les facteurs STATs sont exprimés de manière ubiquitaire dans l'embryon. Ils sont activés dans de nombreux types de cellules par diverses cytokines, facteurs de croissance et interférons , et ce sont des substrats pour les tyrosine kinases du Src (Cavaleri and Schöler, 2004).

Les STAT sont activés par la phosphorylation d'un seul résidu tyrosine généralement localisé près de la partie - carboxy terminale. Une fois phosphorylés, les monomères dimérisent via leur domaine Src homologue (SH-2). Cette

Chapitre 1. Revue de littérature

dimérisation révèle un site de liaison sur l'ADN de 9 paires de bases dans la zone régulatrice du gène (Lim and Cao, 2006).

1.4.2. Voies de signalisation de la polarisation M2

1.4.2.1. La voie JAK-STAT

La voie JAK-STAT est reconnues comme l'une des voies principales menant à la polarisation des macrophages M2. Il a été rapporté que JAK1, un membre de la famille des kinases Janus, s'associe aux composants du complexe IL-4R .

Et donc lors de la liaisons de IL-4 ou IL-13 aux récepteurs sur la membrane cellulaire, suivi d'une phosphorylation de JAK1 activera STAT6, conduisant à la régulation à la hausse des gènes de type M2, y compris Ym1, Arg1, Fizz1, IL-10 et MGL1 (Bi et *al.*, 2019).

1.4.3. Gène *STAT6*

Transducteur de signal et activateur de la transcription 6, induit par IL-4 (*STAT6*) est un gène qui code pour une protéine qui fonctionne comme un activateur de transcription (Smith et *al.*, 2018).

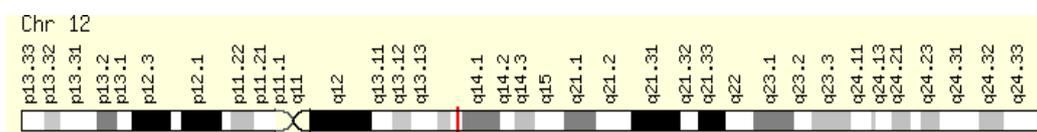


Figure 1.3. Gène *STAT6* dans un emplacement génomique: bandes selon Ensembl, emplacements .

Le gène *STAT6* humain est localisé sur le bras long du chromosome 12 (12q13.3). La même région chromosomique qui code pour l' IFN- γ , l'oxyde nitrique synthase neuronale (NOS) et d'autres gènes impliqués dans la pathogenèse des maladies inflammatoires .Il s'étend sur 19 Kb , et est composé de 23 exons , les deux premiers exons sont non codants [région non traduite en 5 '(5'UTR)]. Avec une taille de 36 736 bases .Un paralogue important de ce gène est *STAT5B* exprimé dans le ganglion lymphatique et l'estomac (Amoako-Sakyi et *al.*, 2016) , (via NCBI (gène)).

Il a été identifié en raison de sa capacité à transmettre les signaux d'un complexe récepteur au noyau et activer l'expression des gènes .En réponse aux cytokines principalement IL-4 et IL-13, et certains facteurs de croissance, les membres de la famille STAT sont phosphorylés par les kinases associées aux récepteurs, puis

Chapitre 1. Revue de littérature

forment des homo- ou hétérodimères qui sont transloquent vers le noyau cellulaire où ils agissent comme activateurs de transcription (Hou et *al.*, 1994).

1.4.4. Structure protéique du STAT6

STAT6 est un homodimère (composé de deux monomères identiques), de structure quaternaire, avec une taille de 847(AA) acides aminés, et une masse moléculaire de 94135 Da . Capable de se lier à l'ADN lorsqu'il est phosphorylé.

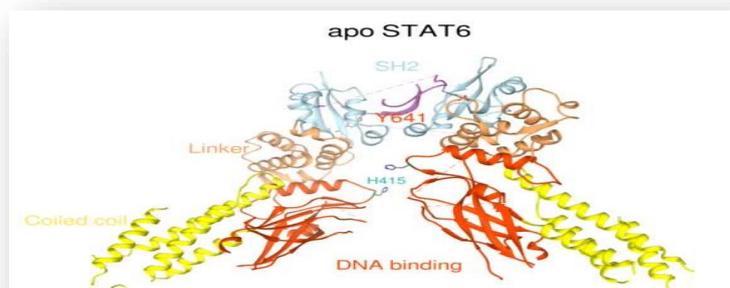


Figure 1.4. Schéma de dessin du complexe STAT6 (en vue de face)

Ils contiennent un domaine de bobine enroulée N-terminal (CCD), un domaine de liaison à l'ADN (DBD), un domaine SH2, une tyrosine conservée et le **segment de queue de la phosphotyrosine** C-terminale (Goenka and Kaplan, 2011).

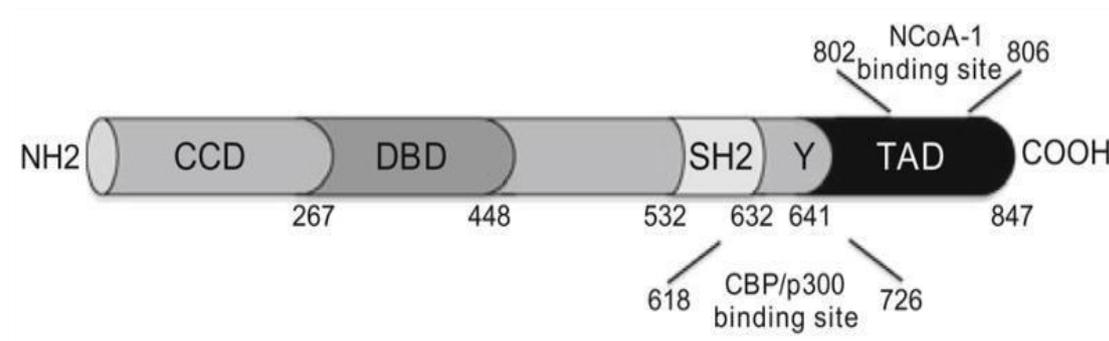


Figure 1.5. structure protéique de STAT6 .

La partie carboxyle-terminale est responsable de sa fonction d'activation de la transcription. La phosphorylation du résidu Y641 se produit au niveau du segment de queue de la phosphotyrosine des deux monomères. Les acides aminés dans les **segments de queue de phosphotyrosine** interagissent avec les acides aminés dans le domaine **SH2** du monomère adjacent via **des liaisons** hydrogènes montrant des liaisons hydrogènes; les liaisons hydrogène maintiennent ensemble deux monomères STAT6 identiques, formant l'homodimère STAT6. La dimérisation de STAT6 phosphorylé forme une feuille bêta antiparallèle (Goenka and Kaplan, 2011).

Chapitre 1. Revue de littérature

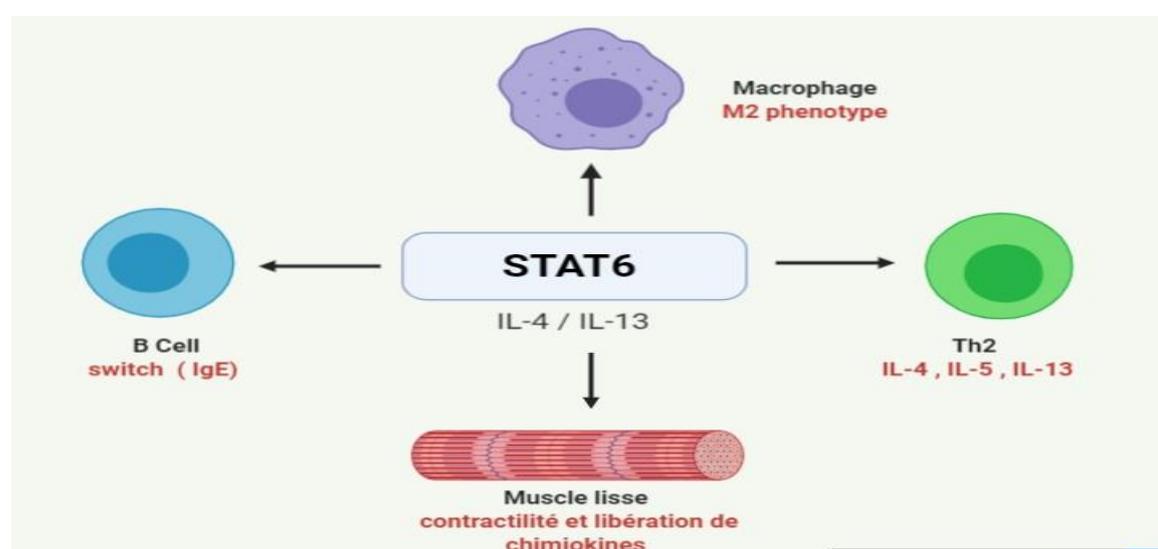
Une différence structurelle clé entre les dimères de STAT6 et STAT1 / STAT3 est située dans la région de la boucle C-terminale (609–620 aa) du domaine SH2. Dans STAT1 et STAT3, la boucle du terminal C est 10 aa plus longue que dans STAT6 (Li et *al.*, 2016).

1.4.5. Rôle de STAT6

STAT6 effectue une double fonction: transduction du signal et l'activation de la transcription des gènes, impliqué dans la signalisation médiée par IL4 et IL13. Comme elle joue un rôle central dans l'exercice de réponses biologiques, y compris la différenciation des cellules Th2, la production d'IgE, de chimiokines et de mucus aux sites d'inflammation allergique (Godava et *al.*, 2013).

Il s'avère induire l'expression de BCL2L1 / BCL-X (L), qui est responsable de l'activité anti-apoptotique de l'IL4, l'expression des marqueurs de surface cellulaire et le changement de classe des immunoglobulines (Godava et *al.*, 2013).

Outre son rôle clé dans la régulation des cytokines extracellulaires et des infections virales, STAT6 est également impliqué dans la réponse immunitaire contre les infections à nématodes et le développement de maladies inflammatoires allergiques (c.-à-d. Hyperréactivité des voies aériennes ou inflammation éosinophile) (Gu et *al.*,



2018).

figure 1.6. Rôle de STAT6 . fonctions effectrices médiée par STAT6 dans plusieurs types de cellules dans l'inflammations.

Chapitre 1. Revue de littérature

La protéine est spécifiquement importante pour des fusions, des mutations faux-sens, des mutations non-sens, des mutations silencieuses et des suppressions et insertions de décalage de cadre sont observées dans des cancers tels que le cancer de l'endomètre, le cancer intestinal et le cancer de la peau (Gordon and Martinez, 2010).

Les aberrations dans la signalisation médiée par STAT6 sont associée au développement de l'asthme et des maladies du système immunitaire .comme elle est liée à la prolifération des cellules cancéreuses et fortement exprimée dans diverses lymphomes malins humains et des cancers pancréatiques, colorectaux, de la prostate et du sein (Salguero-Aranda et *al.*, 2019).

1.4.6. Protéine STAT6 et macrophage M2

L'activation du transducteur de signal et de l'activateur de la transcription 6 STAT6 est une voie de signalisation clé dans la fonction des macrophages, et est nécessaire pour l'activation dite alternative M2 des macrophages et l'induction d'un phénotype anti-inflammatoire . IL-4 et IL-13 sont des cytokines importantes pour la polarisantes M2, qui induisant une phosphorylation de STAT6 et favorisant la transcription des gènes sensibles à STAT6 (Cai et *al.*, 2019).

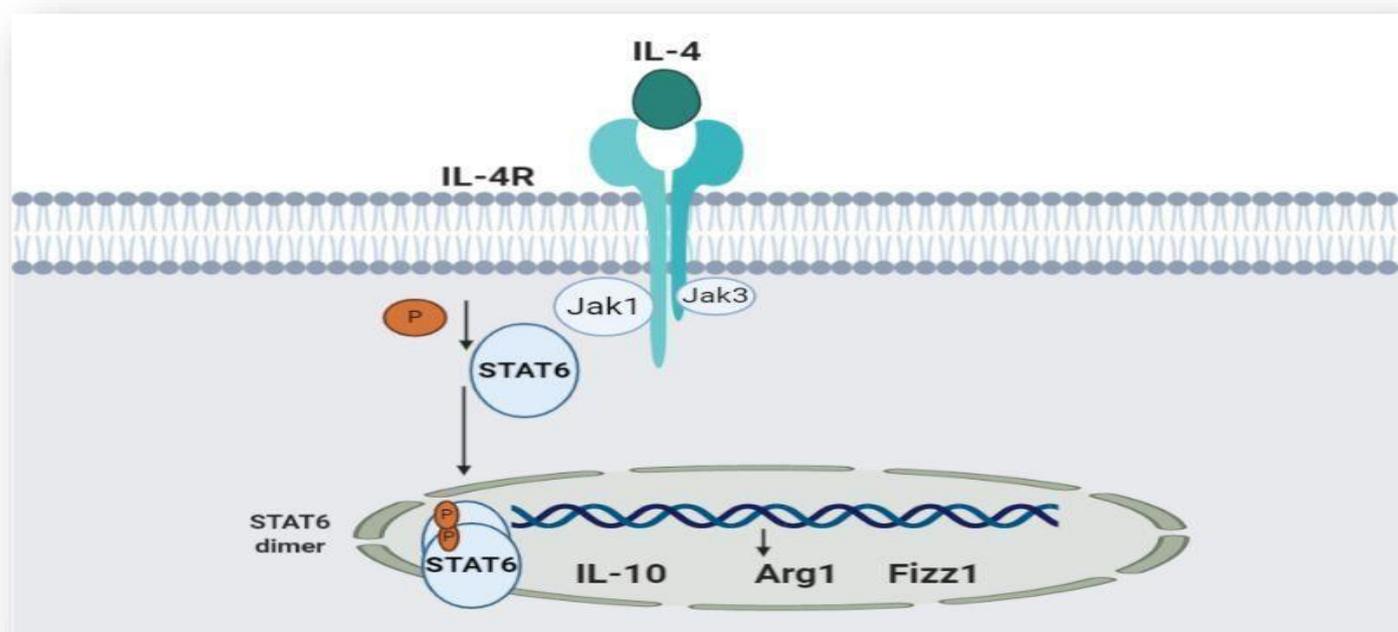


Figure 1.7. activation et phosphorylation de STAT6 . la signalisation IL-4 conduit à la phosphorylation de STAT6 .

Chapitre 1. Revue de littérature

Une fois l'IL-4 et l'IL-13 associée à leurs récepteurs correspondants, il induit l'activation de JAK. Qui provoque la phosphorylation des résidus de tyrosine sur IL-4R α et IL-13R α . STAT6 est ensuite recruté pour le récepteur phosphorylé par l'homologie Src 2 (SH2) domaine, et permet à (Tyr641) de phosphoryler STAT6 suivi de sa dimérisation. A la fin le STAT6 activé s'accumule dans le noyau des cellules cibles et induit la transcription des gènes (Waqas et *al.*, 2019).

La signalisation IL-4 - STAT6, par la répression transcriptionnelle directe des amplificateurs inflammatoires, induit une désensibilisation des macrophages aux microbes, au stress aux dommages, et au signaux endogènes associés. En inhibant les lésions tissulaires induites par les nématodes et réduisant le nombre de parasites (Czimmerer et *al.*, 2018).

1.4.7. Les variantes SNPs du gène STAT6 associé au profil anti-inflammatoire des M2

Les SNPs (polymorphismes mononucléotidique) ce sont des marqueurs moléculaires constituant la forme la plus abondante de variations génétiques dans le génome humain. Observés dans divers états pathologiques associés à la sensibilité ou à la résistance à des traitements spécifiques (Lim et *al.*, 2013).

Plusieurs études se sont intéressées à l'analyse des SNP *STAT6*, qu'ont été associés à une allergie alimentaire , asthme, IgE totales, et œsophagite à éosinophiles (Lim et *al.*, 2013).

Il existe plusieurs SNP validés et répertoriés dans la liste de données dbSNP , Parmi les SNP les plus étudiés chez l'homme : rs3024974 /rs1059513/ rs71802646/rs2598483. (Via NCBI SNP).

Le SNP intronique *STAT6* rs3024974 provoqué par une transition de C à T dans l'intron 18 du gène ,et donc *STAT6* humain est un SNP qui pourrait être intéressant dans la pathogenèse du paludisme (Amoako-Sakyi et *al.*, 2016).

Plusieurs polymorphismes au niveau de 5'UTR du gène. Notamment le polymorphisme de répétition GT rs71802646 qui contient 7 allèles différents, selon le nombre de répétitions GT, variant en taille de (GT) 12 à (GT) 18 .Dans la population indienne, ils sont observé un spectre plus large de répétitions GT, de 13 à 24 répétitions. L'allèle (GT) 13 était beaucoup plus fréquent dans les enfants

Chapitre 1. Revue de littérature

souffrant de maladies allergiques (asthme bronchique, dermatite atopique et / ou anaphylaxie d'origine alimentaire) (Godava et *al.*, 2013).

Deux autres polymorphismes identifiés dans la région promotrice. Le premier rs2598483 est situé 77 pb en amont de la boîte CCAAT, suggérée comme étant un amplificateur, et 1771 pb en amont d'un site d'initiation transcriptionnelle proéminent. La seconde se situe plus près du site de initiation de la transcription, 1216 pb en amont, et 474 pb en aval du boîtier CCAAT. Bien qu'ils soient relativement proches de la boîte du CCAAT et pourrait donc avoir un impact sur l'activité de transcription du gène, ils n'étaient pas associés à l'asthme, nombre périphérique de cellules éosinophiles ou niveau total d'IgE dans la Caucase population (Wang et *al.*, 2011).

1.5. Polymerase Chain Reaction (PCR)

1.5.1. Définition et principe

La PCR est une technique qui permet d'amplifier, selon un mode exponentiel, un fragment d'ADN double brin. Il consiste à utiliser de manière répétée l'activité polymérisique d'une ADN polymérase thermorésistante (Taq polymérase), extraite d'une bactérie thermophile «*Thermus aquaticus*», par un procédé d'extension de deux amorces spécifiques encadrant la séquence à amplifier. La taille des oligonucléotides utilisés comme amorces est généralement comprise entre 18 et 25 bases (Tagu, 1999).

1.5.2 Etapes de la PCR

La PCR repose sur un processus cyclique de 3 étapes :

Première étape : Dénaturation thermique de l'ADN (de 92°C à 94°C) : Cette étape consiste à séparer par la chaleur les deux brins d'ADN en rompant les liaisons d'hydrogène. L'ADN passe sous forme de simple brin et les 2 brins peuvent alors servir de matrice.

Deuxième étape : Hybridation des amorces (entre 45°C et 65°C) : Les amorces en large excès, s'hybrident à tout ADN comportant la séquence complémentaire.

Troisième étape : Elongation des amorces (de 70 °C à 72°C) : L'ADN polymérase (Taq polymérase) allonge les amorces en incorporant les dNTP « Désoxynucléotides triphosphates » complémentaires de la séquence de la matrice à laquelle elle est hybridée.

Chapitre 1. Revue de littérature

La synthèse se fait dans le sens 5'→3', et le cycle se répète (n)fois dans un appareil appelé « Thermocycleur » qui permet de programmer les différentes températures, la durée de chaque étape et le nombre de cycle (n).

Il en résulte à la fin de l'amplification un dédoublement par un facteur de 2ⁿ de la quantité de l'ADN cible.

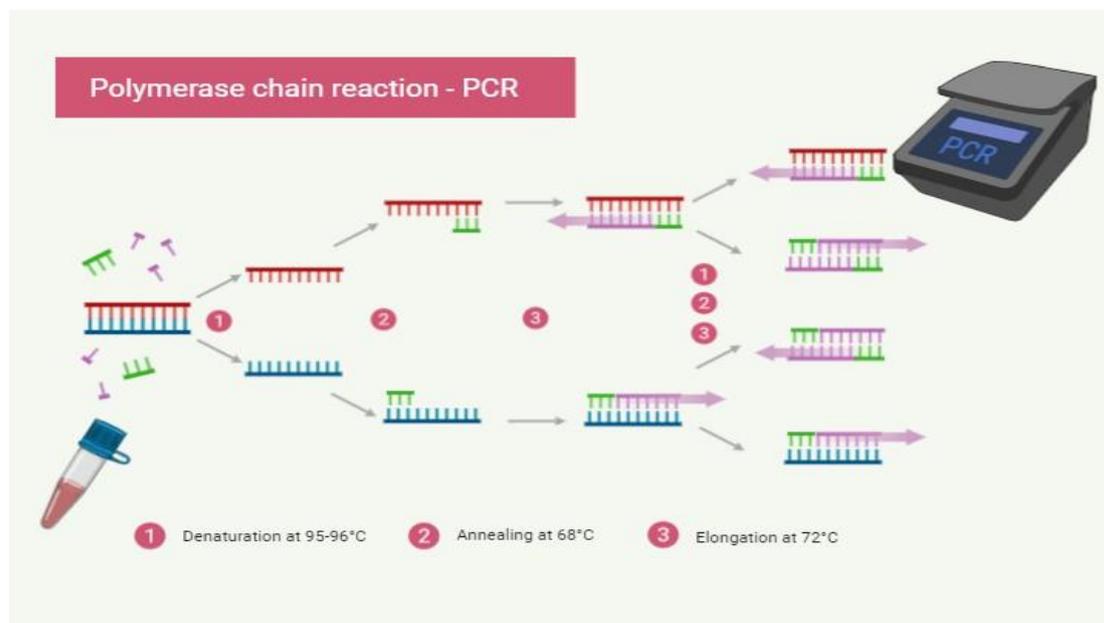


Figure 1.8. principe de la PCR

1.6. Problématique et objectifs

en tant que composant essentiel de l'immunité innée, les macrophages sont capables de se différencier en réponse à divers signaux ou dans différentes conditions physiopathologiques, ils peuvent acquérir des phénotypes fonctionnels distincts en subissant une polarisation phénotypique différente, dont la façon de La polarisation des macrophages M2 implique l'activation de STAT6, qui intervient dans l'activation transcriptionnelle des gènes spécifiques aux macrophages M2 . par ailleurs de nombreux polymorphismes génétiques à un seul nucléotide (SNP) au niveau du gène STAT6, ont été associés à plusieurs maladies . Donc, dans cette optique une conception d'amorce et très importante pour la réussite d'une PCR .Et pour que plu tard ces amorces feront l'objet d'une étude cas témoins

1.6.1. Objectif

concevoir des amorces de gène *STAT-6* qui a été associée à certains maladie pour la réalisation d'une PCR.

Chapitre 1. Revue de littérature

1.6.2. But

Etudier l'expression de la voie de signalisation STAT6 au niveau du macrophage via la mesure du taux d'expression du gène STAT6.

Chapitre 2. Matériel et Méthodes

Chapitre 2. Matériel et méthodes

2.1. Conception d'amorce

La conception des amorces est sans doute le paramètre le plus important pour le succès de la PCR. Une amorce mal conçue peut empêcher le fonctionnement de la réaction PCR. La séquence d'amorce détermine plusieurs paramètres, telles que la position et la longueur du produit, sa température de fusion et le rendement.

Une amorce (ou "oligo" ou encore "primer") est une petite séquence d'ADN d'intérêt utilisée pour démarrer la réplication de l'ADN lors de la PCR. C'est donc une séquence complémentaire à une région située au début de l'ADN que l'on veut amplifier. Il faut bien choisir l'amorce pour que l'efficacité de la PCR soit optimale. Plusieurs facteurs interviennent dans ce choix:

- La spécificité : les amorces doivent être choisies de telle sorte qu'elles aient une séquence unique dans l'ADN matrice qui doit être amplifié.
- la taille : la séquence doit être assez longue pour être suffisamment spécifique et ne se lier qu'à l'endroit voulu, mais assez courte pour que l'appariement se fasse rapidement et complètement. La taille optimale est de 18-22 bases.
- La température de fusion (T_m), à partir de laquelle l'amorce double-brin se dissocie. Notée T_m (melting temperature), il vaut mieux la choisir entre 52 °C et 58 °C.
- La quantité de G et C : les appariements G-C étant plus stables que les appariements A-T, il est bon d'avoir un pourcentage de G et C dans l'amorce d'au moins 40% à 60%.
- Le « OC clamp », c'est-à-dire le nombre de G et C dans les cinq dernières bases à l'extrémité 3' de la séquence. Il vaut mieux en avoir au moins deux. En effet, pour que la réplication démarre il faut que l'extrémité 3' soit bien appariée jusqu'au bout, ce qui n'est pas vraiment nécessaire en 5'

Chapitre 2. Matériel et Méthodes

- Dans les ressources du National Center for Biotechnology Information (NCBI) nous avons utilisé le logiciel Primer BLAST que se trouve dans le site « www.ncbi.nlm.nih.gov ».
- Les étapes consécutives d'utilisation de Primer BLAST sont illustrées dans la **figure 2.1**

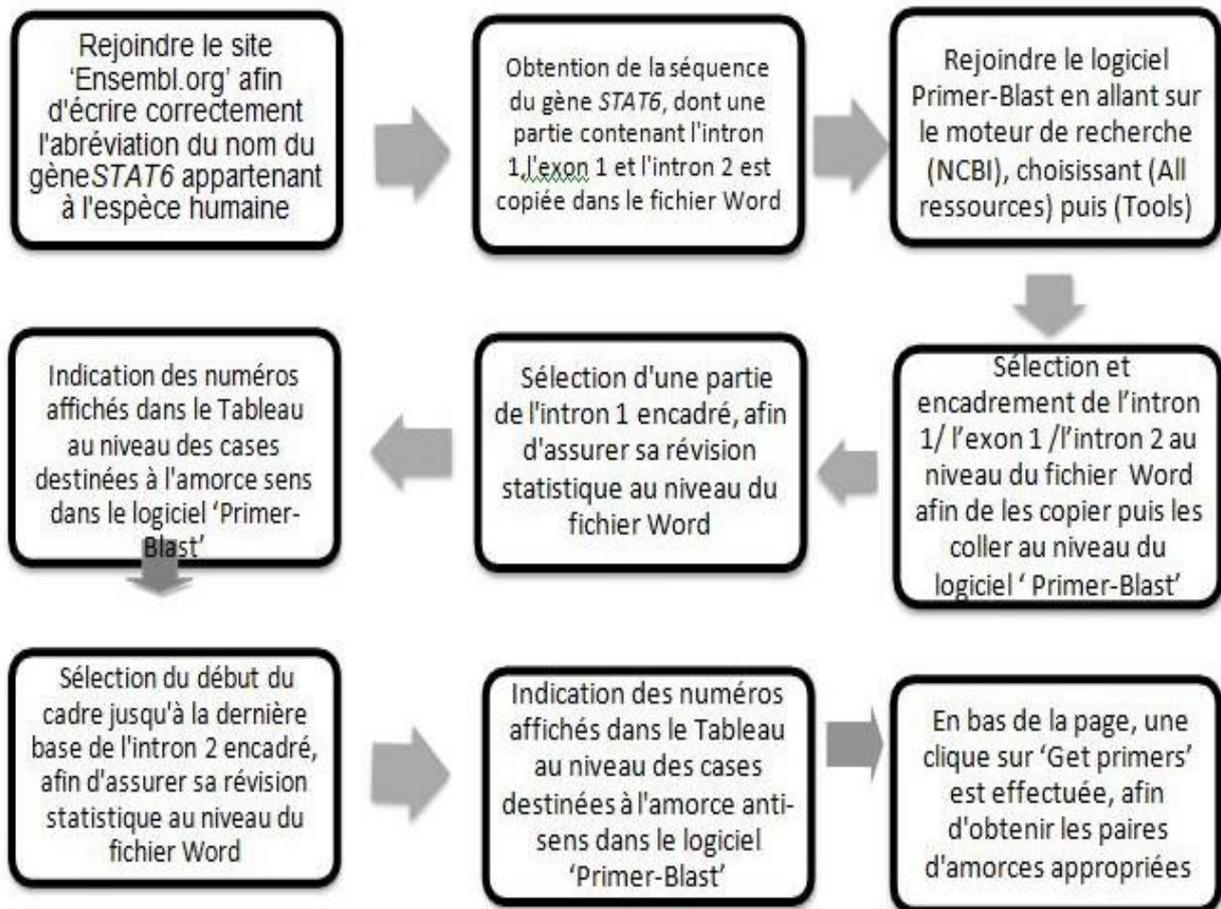


Figure 2.1. Les étapes d'une conception d'amorce par le Primer BLAST

Chapitre 3.Résultats

Chapitre 3. Résultats

3.1.Résultats de la conception des amorces :

L'utilisation de l'outil Primer-BLAST a permis d'obtenir 10 couples d'amorces mais chacun présentait un produit aspécifique de 144 à 225 paires de bases (pb), donc ce résultat n'est pas pris en compte.

Nous avons par la suite élargie la séquence à amplifier, afin de fournir au logiciel un plus large choix de séquences pour les amorces.

Grâce au logiciel Primer-BLAST nous avons obtenue un couple d'amorce spécifique du gène *STAT6*.

Paire d'amorces 8

	Séquence (5' -> 3')	Brin de modèle	Longueur	Début	Arrêtez	Tm	GC%	Auto-complémentarité	Complémentarité Self 3'
Apprêt avant	CCAGCACTACCAAGTCAGGG	Plus	20	440	459	60.04	60,00	3,00	1,00
Apprêt inverse	TGCACATCAGAACCCCAAG	Moins	20	622	603	60,25	55,00	4,00	0,00
Longueur du produit	183								

Figure 3.1. Résultats de primer BLAST

- La paire d'amorce numéro 8 est la bonne paire d'amorce utilisable pour la PCR avec un seul produit spécifique de 183pb .

Dans notre cas là la température d'hybridation des amorces est de 60°C. La longueur des amorces optimales obtenues est de 20 nucléotides. En général plus l'amorce est longue, moins l'hybridation est efficace, les amorce de fragment utilisé donnent un produit de 183pb, ces amorces ont une teneur GC de 55% a 60%, leur température d'hybridation et de 60.04 et 60.25 respectivement dans l'amorce sens et anti sens.

Les couples d'amorces de la séquence du gène :

L'amorce gauche 5' CCAGCACTACCAAGTCAGGG'3

L'amorce droite 5' TGCACATCAGAACCCCAAG'3

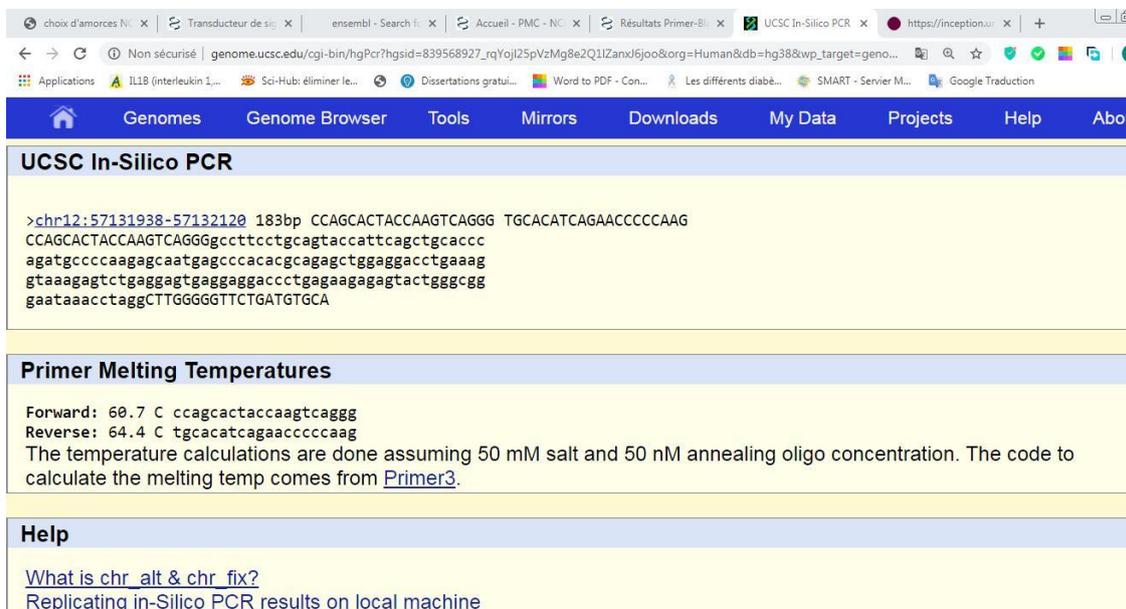
Chapitre 3.Résultats

3.2.Confirmations des résultats:

Pour confirmer la qualité des résultats obtenus et la fonctionnalité des amorces obtenus, nous avons réalisé une PCR virtuelle, en utilisant l'outil UCSC de l'université de Californie (<http://genome.ucsc.edu/>) .

Les résultats obtenus, ont d'abord confirmé la taille du produit d'amplification obtenu en effet le produit obtenu est de 183pb, comparable à celui obtenu en utilisant l'outil bioinformatique Primer-BLAST.

L'utilisation d'UCSC nous a permis également de confirmer la spécificité des amorces conçues, le chromosome porteur du gène *STAT6*, la séquence des amorces et la température d'hybridation .



The screenshot shows the UCSC In-Silico PCR tool interface. The browser address bar displays the URL: <https://inception.u...>. The page title is "UCSC In-Silico PCR". The main content area is divided into three sections:

- UCSC In-Silico PCR**: Displays the sequence of the amplified product: `>chr12:57131938-57132120 183bp CCAGCACTACCAAGTCAGGG TGCACATCAGAACCCCAAG CCAGCACTACCAAGTCAGGGccttcctgcagttaccattcagctgcacc agatgccccagagcaatgagccacacgcagagctggaggacctgaaag gtaaaagagtctgaggagtgaggaggaccctgagaagagagtactgggggg gaataaacctaggCTTGGGGTTCTGATGTGCA`
- Primer Melting Temperatures**: Shows the melting temperatures for the forward and reverse primers: `Forward: 60.7 C ccagcactaccaagtcaggg` and `Reverse: 64.4 C tgcacatcagaaccccaag`. It also includes a note: "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**: Provides links for [What is chr_alt & chr_fix?](#) and [Replicating in-Silico PCR results on local machine](#).

Figure 3.2 : confirmation des résultats par le site UCSC in silico PCR

Chapitre 4. Discussion

Grâce à l'outil Primer BLAST nous avons pu réussir la conception d'amorces du gène *STAT6*, porté par le chromosome 12, qui assure plusieurs fonctions biologique. Cependant, comme les macrophages M1, une activités excessive ou incontrôlés des macrophages M2 suit à des mutation provoque l'apparition de plusieurs maladies liées aux macrophages alternativement activés .

Nous avons conçu à partir de la séquence du gène *STAT6*, une bonne paire d'amorce spécifiques avec une taille, une position, et une longueur bien déterminés ainsi que leur teneur en CG% .

Cette paire d'amorce peut donc être utilisée en PCR afin de mesurer l'expression du gène *STAT6* au niveau des macrophages anti-inflammatoires, pour pouvoir déterminer de manière concluante que le gène de cette protéine de transcription est lié au développement de certaines pathologies .

Chapitre 5. Conclusions et perspectives

Chapitre 5. Conclusions et perspectives

Il est important de bien concevoir les amorces avant de réaliser une PCR . Pour cela il existe plusieurs outils de la bioinformatique qui permettent de retrouver les séquences de référence de n'importe quel gène et de concevoir des amorces spécifiques.

Pour cela Nous avons élaborer une conception des amorces a partir de l'outil Primer BLAST, pour le gène *STAT6* dont le produit au niveau des macrophages M2 joue un rôle reconnu dans la survenue de certains maladies comme le cancer et l'allergie .

L'étude de son expression génétique consiste à utiliser des amorces bien spécifiques afin de pouvoir amplifier la région en question, ceci représente une étape préalable, et indispensable à toute analyse de biologie moléculaire.

Nous avons obtenu grâce a ce travail, notre paire d'amorce du gène *STAT6* qui située sur le chromosome 12 et présenté par la 8 paire d'amorce par le primer Blast. Cela pourra faire l'objet dans l'avenir d'une étude d'association de l'expression génétique avec la survenue de ces pathologies.

Chapitre 6. Bibliographie

Chapitre 6 : Bibliographie

A

amoako-sakyi, d., adukpo, s., kusi, k.a., dodoo, d., ofori, m.f., adjei, g.o., edoh, d.e., asmah, r.h., brown, c., adu, b., et al. (2016). a stat6 intronic single-nucleotide polymorphism is associated with clinical malaria in ghanaian children. *genet epigenet* 8, 7–14.

B

bi, y., chen, j., hu, f., liu, j., li, m., and zhao, l. (2019). m2 macrophages as a potential target for antiatherosclerosis treatment. *neural plast.* 2019, 6724903.

biswas, s.k., and mantovani, a. (2010). macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *nat. immunol.* 11, 889–896.

C

cai, w., dai, x., chen, j., zhao, j., xu, m., zhang, l., yang, b., zhang, w., rocha, m., nakao, t., et al. (2019). stat6/arg1 promotes microglia/macrophage efferocytosis and inflammation resolution in stroke mice. *jci insight* 4.

cavaleri, f., and schöler, h. (2004). molecular facets of pluripotency. in *handbook of stem cells*, (elsevier), pp. 27–44.

czimmerer, z., varga, t., kiss, m., vázquez, c.o., doan-xuan, q.m., rückerl, d., tattikota, s.g., yan, x., nagy, z.s., daniel, b., et al. (2016). the il-4/stat6 signaling axis establishes a conserved microRNA signature in human and mouse macrophages regulating cell survival via mir-342-3p. *genome med* 8, 63.

czimmerer, z., daniel, b., horvath, a., rückerl, d., nagy, g., kiss, m., peloquin, m., budai, m.m., cuaranta-monroy, i., simandi, z., et al. (2018). the transcription factor stat6 mediates direct repression of inflammatory enhancers and limits activation of alternatively polarized macrophages. *immunity* 48, 75-90.e6.

D

duque-correa, m.a., kühl, a.a., rodriguez, p.c., zedler, u., schommer-leitner, s., rao, m., weiner, j., hurwitz, r., qualls, j.e., kosmiadi, g.a., et al. (2014). macrophage arginase-1 controls bacterial growth and pathology in hypoxic tuberculosis granulomas. *proc. natl. acad. sci. u.s.a.* 111, e4024-4032.

F

frodermann, v., and nahrendorf, m. (2018). macrophages and cardiovascular health. *physiol. rev.* 98, 2523–2569.

Chapitre 6. Bibliographie

G

godava, m., vrtel, r., and vodicka, r. (2013). stat6 - polymorphisms, haplotypes and epistasis in relation to atopy and asthma. *biomed pap med fac univ palacky olomouc czech repub* 157, 172–180.

goenka, s., and kaplan, m.h. (2011). transcriptional regulation by stat6. *immunol. res.* 50, 87–96.

gordon, s., and martinez, f.o. (2010). alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *immunity* 32, 593–604.

gu, f., wang, c., wei, f., wang, y., zhu, q., ding, l., xu, w., zhu, c., cai, c., qian, z., et al. (2018). stat6 degradation and ubiquitylated triml2 are essential for activation of human oncogenic herpesvirus. *plos pathog.* 14, e1007416.

H

hill, c.s., and treisman, r. (1995). transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *cell* 80, 199–211.

hou, j., schindler, u., henzel, w.j., ho, t.c., brasseur, m., and mcknight, s.l. (1994). an interleukin-4-induced transcription factor: il-4 stat. *science* 265, 1701–1706.

huang, z., luo, q., yao, f., qing, c., ye, j., deng, y., and li, j. (2016). identification of differentially expressed long non-coding rnas in polarized macrophages. *sci rep* 6, 19705.

J

jablonski, k.a., amici, s.a., webb, l.m., ruiz-rosado, j. de d., popovich, p.g., partida-sanchez, s., and guerau-de-arellano, m. (2015). novel markers to delineate murine m1 and m2 macrophages. *plos one* 10, e0145342.

K

kapellos, t.s., and iqbal, a.j. (2016). epigenetic control of macrophage polarisation and soluble mediator gene expression during inflammation. *mediators inflamm.* 2016, 6591703.

koh, y.-c., yang, g., lai, c.-s., weerawatanakorn, m., and pan, m.-h. (2018). chemopreventive effects of phytochemicals and medicines on m1/m2 polarized macrophage role in inflammation-related diseases. *int j mol sci* 19.

L

lavin, y., mortha, a., rahman, a., and merad, m. (2015). regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *nat. rev. immunol.* 15, 731–744.

lee, w.j., tateya, s., cheng, a.m., rizzo-deleon, n., wang, n.f., handa, p., wilson, c.l., clowes, a.w., sweet, i.r., bomszyk, k., et al. (2015). m2 macrophage polarization

Chapitre 6. Bibliographie

mediates anti-inflammatory effects of endothelial nitric oxide signaling. *diabetes* 64, 2836–2846.

li, j., rodriguez, j.p., niu, f., pu, m., wang, j., hung, l.-w., shao, q., zhu, y., ding, w., liu, y., et al. (2016). structural basis for dna recognition by stat6. *proc natl acad sci usa* 113, 13015–13020.

lim, c.p., and cao, x. (2006). structure, function, and regulation of stat proteins. *mol. biosyst.* 2, 536.

lim, y.-p., hsu, y.-a., tsai, k.-h., tsai, f.-j., peng, c.-y., liao, w.-l., hung, d.-z., tien, n., lin, c.-y., and wan, l. (2013). the impact of polymorphisms in stat6 on treatment outcome in hcv infected taiwanese chinese. *bmc immunol.* 14, 21.

M

mariani, s.a., li, z., rice, s., krieg, c., fragkogianni, s., robinson, m., vink, c.s., pollard, j.w., and dzierzak, e. (2019). pro-inflammatory aorta-associated macrophages are involved in embryonic development of hematopoietic stem cells. *immunity* 50, 1439-1452.e5.

martinez, f.o., helming, l., and gordon, s. (2009). alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *annu. rev. immunol.* 27, 451–483.

martinez, f.o., helming, l., milde, r., varin, a., melgert, b.n., draijer, c., thomas, b., fabbri, m., crawshaw, a., ho, l.p., et al. (2013). genetic programs expressed in resting and il-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. *blood* 121, e57–e69.

mosser, d.m., and edwards, j.p. (2008a). exploring the full spectrum of macrophage activation. *nat. rev. immunol.* 8, 958–969.

murray, p.j., and wynn, t.a. (2011). protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *nat. rev. immunol.* 11, 723–737.

P

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? *j immunol res* 2018, 8917804.

S

salguero-aranda, c., sancho-mensat, d., canals-lorente, b., sultan, s., reginald, a., and chapman, l. (2019). stat6 knockdown using multiple sirna sequences inhibits proliferation and induces apoptosis of human colorectal and breast cancer cell lines. *plos one* 14, e0207558.

saradna, a., do, d.c., kumar, s., fu, q.-l., and gao, p. (2018). macrophage polarization and allergic asthma. *transl res* 191, 1–14.

Chapitre 6. Bibliographie

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.

smith, m.h., islam, n.m., bhattacharyya, i., cohen, d.m., and fitzpatrick, s.g. (2018). stat6 reliably distinguishes solitary fibrous tumors from myofibromas. *head neck pathol* 12, 110–117.

de souza, j.r., da costa vasconcelos, p.f., and quaresma, j.a.s. (2019). functional aspects, phenotypic heterogeneity, and tissue immune response of macrophages in infectious diseases. *infect drug resist* 12, 2589–2611.

T

tagu, d. (1999). principes des techniques de biologie moléculaire (paris: institut national de la recherche agronomique).

W

wang, n., liang, h., and zen, k. (2014). molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *front immunol* 5, 614.

wang, q., bai, x.t., xu, d.q., li, h., xu, c.y., and fang, j.l. (2011). association of polymorphisms of stat6 and so(2) with chinese childhood asthma: a case-control study. *biomed. environ. sci.* 24, 670–677.

waqas, s.f.h., ampem, g., and röszer, t. (2019). analysis of il-4/stat6 signaling in macrophages. in nuclear receptors, m.z. badr, ed. (new york, ny: springer new york), pp. 211–224.

Z

zizzo, g., and cohen, p.l. (2013). il-17 stimulates differentiation of human anti-inflammatory macrophages and phagocytosis of apoptotic neutrophils in response to il-10 and glucocorticoids. *j. immunol.* 190, 5237–5246.

مقدمة: البلاعم هي خلية جهاز مناعة من أصل مكون للدم وتلعب دورًا حاسمًا في المناعة الفطرية، والحماية من مسببات الأمراض المختلفة وكذلك توازن الأنسجة. تتبنى حالة تنشيط مقدمة من نوعين فرعيين، M1 المؤيد للالتهابات و M2 المضاد للالتهابات، المكتسبة عن طريق تنشيط مسارات الإشارات المختلفة، ولا سيما مسار STAT6. تتيح دراسة تعبيرها أثناء الأمراض تسهيل توصيف هذه الخلايا.

الهدف: تصميم البادئات الجينية STAT-6 التي ارتبطت بأمراض معينة من أجل أداء تفاعل البوليميراز المتسلسل.

المواد والطريقة: هناك عدة خطوات لتصميم أزواج برايمر جيدة. أولاً، تم أخذ تسلسل الجين STAT6 من موقع ENSEMBL. بعد ذلك، من خلال المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI) ومن خلال استخدام أداة Primer Blast، تم تصميم مواد أولية خاصة بجين STAT6. أخيراً، تم التحقق من زوج البادئات والذي يفي بمعايير اختيار البادئات الجيدة المختارة بواسطة PCR- في السيليكون.

النتائج: من بين 10 أزواج من البادئات الخاصة بجين STAT6 التي تم الحصول عليها، اخترنا الزوج الثامن من البادئات لأنه يفي بمعايير البادئات الجيدة.

الخلاصة: تصميم زوج تمهيدي جيد يساعد في تحقيق تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل، وبالتالي التضخيم الصحيح لجين STAT6 ودراسة دوره في بعض الأمراض المضادة للالتهابات.

الكلمات المفتاحية: Macrophage، STAT-6، مضاد للالتهابات، تعدد الأشكال، تصميم أول

Résumé

Introduction : Le macrophage est une cellule du système immunitaire d'origine hématopoïétique qui joue un rôle crucial dans l'immunité innée, la protection contre différents pathogènes ainsi que l'homéostasie des tissus. Ils adoptent un états d'activation présentés par deux sous-types, M1 pro-inflammatoire et M2 anti- inflammatoire, acquis par l'activation de différentes voies de signalisation notamment la voie STAT6. L'étude de leur expression au cours des pathologies permet de faciliter la caractérisation de ces cellules.

Objectif : concevoir des amorces de gène STAT-6 qui a été associée à certains maladie pour la réalisation d'une PCR.

Matériels et méthode : La conception de bonnes paires d'amorces passe par plusieurs étapes. D'abord, la séquence du gène STAT6 a été prise à partir du site ENSEMBL. Ensuite, À travers le centre national de l'information biotechnologique (NCBI) et par l'utilisation de l'outil Primer Blast, les amorces spécifiques au gène STAT6 ont été conçues. Enfin, la paire d'amorces choisie et qui répond aux critères de choix de bonnes amorces a été vérifié par -PCR in silico.

Résultats : Parmi les 10 paires d'amorces spécifiques du gène STAT6 obtenues, nous avons choisi la huitième paire d'amorces car elle répond aux critères de bonnes amorces.

Conclusion : Concevoir une bonne paire d'amorce aide à réussir la technique PCR, et donc l'amplification correcte du gène STAT6 et l'étude de son rôle dans certain maladies anti-inflammatoires .

Mots clés : Macrophage , STAT-6 , anti-inflammation , polymorphisme, conception d'amorce

Abstract

Background: The macrophage is an immune system cell of hematopoietic origin that plays a crucial role in innate immunity, protection against various pathogens as well as tissue homeostasis. They adopt an activation state presented by two subtypes, pro-inflammatory M1 and anti-inflammatory M2, acquired by the activation of different signaling pathways, in particular the STAT6 pathway. The study of their expression during pathologies makes it possible to facilitate the characterization of these cells.

Objective: to design STAT-6 gene primers which has been associated with certain diseases for the performance of PCR.

Materials and Method: There are several steps to designing good primer pairs. First, the sequence of the STAT6 gene was taken from the ENSEMBL site. Then, through the National Biotechnology Information Center (NCBI) and through the use of the Primer Blast tool, primers specific to the STAT6 gene were designed. Finally, the pair of primers chosen and which meets the criteria for choosing good primers was verified by -PCR in silico.

Results: Among the 10 pairs of primers specific for the STAT6 gene obtained, we chose the eighth pair of primers because it meets the criteria for good primers.

Conclusion: Designing a good primer pair helps to achieve the PCR technique, and therefore the correct amplification of the STAT6 gene and the study of its role in certain anti-inflammatory diseases.

Keywords: Macrophage, STAT-6, anti-inflammation, polymorphism, primer design

