

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

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

Département de Biologie

Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et d'Immunologie W04144100

MEMOIRE

Présenté par

Gouber Abd El Wadoud

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Immunologie

Thème

**Conception des amorces pour le gène *IL-13* exprimé par le macrophage
alternativement activé M2 au cours de l'allergie**

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

Président	ARIBI Mourad	Professeur	Université de Tlemcen
Encadreur	NOUARI Wafa	MCB	Université de Tlemcen
Examineur	MILIANI Marwa	MAB	Université de Tlemcen

Année universitaire 2019/2020

Résumé

Introduction : Lorsqu'il est exposé à des substances allergiques, le système immunitaire stimule les réactions d'hypersensibilité, dont l'allergie est l'une de ces réactions qui implique des macrophages de type M2. L'expression de l'interleukine-13 au cours de cette réponse immunitaire et son effet sur les maladies allergiques fait l'objet de plusieurs études dont l'étude de son expression par la PCR soit une étape fondamentale pour le dépistage de l'allergie.

Objectif : L'objectif de notre travail est de concevoir des amorces du gène IL-13 pour connaître son effet dans l'allergie.

Matériel et méthodes : Les amorces spécifiques pour le gène IL-13 ont été conçus à l'aide de l'outil Primer-Blast à travers le site « www.ncbi.nih.gov ».

Résultats : Le choix s'est porté sur la neuvième paire des amorces en raison de ses produits aspécifiques qui sont supérieures à 1000 paires de bases et aussi parce qu'elle répond à toutes les conditions requises.

Conclusion : La paire d'amorce sélectionnée sera utilisée pour amplifier le gène IL-13 par la PCR afin que les chercheurs puissent étudier son implication dans l'allergie.

Mots clés : Allergie, Macrophage M2, Interleukine-13, PCR, Conceptions des amorces.

Abstract

Introduction: When exposed to allergic substances, the immune system stimulates hypersensitivity reactions, of which allergy is one of those reactions that involves type M2 macrophages. The expression of interleukin-13 during this immune response and its effect on allergic diseases is the subject of several studies, including the study of its expression by PCR is a fundamental step in the screening of allergy.

Objective: The objective of our work is to design primers for the IL-13 gene to know its effect in allergy.

Material and methods: The primers specific for the IL-13 gene were designed using the Primer-Blast tool through the site "www.ncbi.nlm.nih.gov".

Results: The choice fell on the ninth pair of primers because of its non-specific products which are larger than 1000 base pairs and also because it meets all the required conditions.

Conclusion: The selected primer pair will be used to amplify the IL-13 gene by PCR so that researchers can study its involvement in allergy.

Keywords: Allergy, Macrophage M2, Interleukin-13, PCR, Primer designs.

ملخص

مقدمة: عند التعرض لمسببات الحساسية، يطلق الجهاز المناعي تفاعلات فرط الحساسية، و احد هذه التفاعلات يشمل الخلايا البالعة من النوع M2. إن التعبير عن الأنترلوكين-13 أثناء هذه الاستجابة المناعية وتأثيره على أمراض الحساسية هو موضوع للعديد من الدراسات التي أجريت أو يمكن أن تجرى، بما في ذلك دراسة تعبيره عن طريق تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) وهو خطوة أساسية في فحص الحساسية.

هدف: الهدف من عملنا هو تصميم بادئات للجين IL-13 لمعرفة تأثيره في أمراض الحساسية.

مواد و طرق: تم تصميم المواد الأولية الخاصة بجين IL-13 باستخدام أداة Primer-Blast من خلال الموقع "www.ncbi.nih.gov".

نتائج: وقع الاختيار على الزوج التاسع من البادئات نظرًا لمنتجاته غير المحددة التي تزيد عن 1000 زوج من القواعد وأيضًا لأنها تلي جميع الشروط المطلوبة.

خلاصة: سيتم استخدام زوج البادئات المحدد لتضخيم جين IL-13 بواسطة PCR حتى يتمكن الباحثون من دراسة مشاركته في الحساسية.

كلمات مفتاحية: حساسية ، البالعات (ماكروفاج M2) ، أنترلوكين 13 ، PCR ، تصميم البادئات.

Avant-propos

Grâce à Dieu le tout Puissant Que je remercie de m'avoir aidé à terminer ce travail.

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et d'Immunologie (Biomolim), Université de Tlemcen. Je remercie énormément son Directeur Pr Mourad ARIBI pour son savoir, sa disponibilité et son aide.

Je tiens à remercier tout particulièrement et chaleureusement Mme Wafa Nouari, Maître de conférences classe B, Biomolim, pour tous ses efforts, sa patience et surtout les précieux conseils qui m'ont beaucoup aidé, je ne le remercierai jamais assez de m'avoir donné le meilleur de lui-même.

Je tiens à remercier également les membres du jury qui ont accepté à examiner ce travail.

J'adresse également mes sincères remerciements à toute l'équipe du Laboratoire Biomolim ainsi que à tous mes enseignants pendant ma formation.

Je dédie mon travail à mon ami, mon support et mon tout Oussama Kfiar qui m'a soutenu dès le début jusqu'à le dernier point, mes très chers parents, mes chers amis: Meriem Habri et Amin Lagha et finalement mes chers collègues: Cyrine, Djihane, Nadjat, Donia, Ghizlane et Walid Sefraoui.

Table des matières

Introduction	1
Chapitre 1. Revue de la littérature	3
1. Hypersensibilité.....	3
1.1. Définition	3
1.2.1. Hypersensibilité de type I (Allergie médiée par l'IgE).....	4
3. Interleukine -13	12
3.1. Gène IL-13	12
3.2. Protéine IL-13.....	12
3.3. Structure	13
4.4. Types de PCR.....	18
4.4.1. PCR qualitative.....	18
4.4.2. PCR quantitative	18
5.1. Objectif	19
5.2. But.....	19
Chapitre 2. Matériel et méthodes	20
2.1. Conception d'amorces	20
2.2. Critères de sélection d'amorce	20
2.3. La longueur de l'amorce.....	20
2.4. La température de fusion	20
2.5. La spécificité.....	20
2.6. La complémentarité	21
2.7. Teneur en G/C.....	21
2.8. La séquence à l'extrémité 3'	21
2.3. La séquence du gène IL-13	21
Chapitre 3. Résultats	26
3.1. Résultat du primer blast.....	26
3.2. Confirmation des résultats : <i>in silico</i> -PCR.....	27
Chapitre 4. Conclusions et perspectives	29
Chapitre 5. Références bibliographiques	30

Liste des Figures

Figure 1.1.	Les découvertes clés dans le domaine d'allergie	03
Figure 1.2.	Processus physiopathologique de l'allergie médiée par les IgE	06
Figure 1.3.	Processus physiopathologique de la réaction d'hypersensibilité de type IV	08
Figure 1.4.	Origine des macrophages	10
Figure 1.5.	Localisation du gène IL13 sur le chromosome 5 humain	12
Figure 1.6.	(A et B) : structure en 3D d'IL-13	13
Figure 1.7.	Représentation de la topologie globale haut-bas-bas de l'IL-13	13
Figure 1.8.	Schéma représente la signalisation IL-13 et IL-4	15
Figure 1.9.	Schéma représente les étapes de la PCR	18
Figure 2.1.	Base de données « Ensembl »	21
Figure 2.2.	La séquence encadrée du gène IL-13 (l'exon 1)	22
Figure 2.3.	Site NCBI	23
Figure 2.4.	L'outil Primer blast	23
Figure 2.5.	Analyse de la séquence d'intérêt par Primer blast	24
Figure 2.6.	L'obtention des résultats à partir de primer blast	24
Figure 2.7.	L'outil <i>in silico</i> -PCR	25
Figure 3.1.	Résultat à partir de l'outil Primer-blast	26
Figure 3.2.	Caractéristiques de la paire d'amorce choisie	27
Figure 3.3.	Confirmation des résultats par <i>in silico</i> -PCR	28

Liste des tableaux

Tableau 3.1.	La comparaison entre les critères d'une bonne amorce et notre amorce	27
---------------------	--	----

Liste des abréviations

CMH II	Complex Majeur d'Histocompatibilité type 2
COX-2	Cyclooxygénase-2
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
DC	Cellules Dendritique
DTH	Delayed Type Hypersensibility (hypersensibilité retardé)
FcεR I	Récepteur de haute affinité pour la région Fc d'immunoglobuline E
GM-CSF	Facteur Stimulant les Colonies de Granulocytes et Macrophages
IFN-γ	Interféron gamma
IgE	Immunoglobuline de type E
IL-4	Interleukine-4
IL-13	Interleukine-13
IL-4Rα	Récepteur alpha IL-4
IL-13Rα1	Récepteur alpha 1 IL-3
IRS	Insuline Récepteur Substrat
IUIS	Union International de Société d'Immunologie
JAK	Janus Kinase
LPS	Lipopolysaccharide
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NCBI	Centre National pour les Information en Biotechnologie
NK	Naturel Killer
NKT	Naturel Killer T
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
P	Phosphore
PCR	Réaction en Chaîne par Polymérase
ROS	Reactive Oxygen Species (espèce réactive de l'oxygène)
RT-PCR	Transcription inverse de la Réaction en Chaîne par Polymérase
STAT	Transducteur de Signal et Activateur de Transcription
TAM	Macrophage Associé au Tumeur
TCR	Récepteur de Cellule lymphocytaire T
Th0	Lymphocyte T helper naïve
Th1	Lymphocyte T helper type 1
Th2	Lymphocyte T helper type 2
TNF-α	Facteur de Nécrose Tumorale alpha
γC	Chaîne gamma

Introduction

L'allergie est une réaction d'hypersensibilité induite par le système immunitaire en répondant à des substances étrangères normalement inoffensives (Tanno Et *al.*, 2016). Ces substances, appelées allergènes, proviennent de nombreuses différentes sources et stimulent le corps humain pour produire les immunoglobulines de type E (IgE), dont la formation de complexe allergène-IgE est la première cause de ces réactions allergiques (Chruszcz Et *al.*, 2018). Les réactions d'hypersensibilités se divisent en quatre différents types, chaque type est reconnu pour son mécanisme d'action.

Les macrophages sont des cellules immunitaires qui ont été découvertes par Elie Metchnikoff en 1893 comme des cellules phagocytaires (Labonte, Tosello-Tramont, Et Hahn 2014). Ces cellules peuvent être ensemencées dans le corps humains dès la phase embryonnaire, ainsi qu'elles peuvent être d'origine de la différenciation des monocytes (Gordon Et Martinez 2010). Les macrophages se différencient en plusieurs sous populations, dont l'environnement cytokinique entraîne leur polarisation vers un profil pro-inflammatoire (M1) ou anti-inflammatoire (M2) (Shapouri-Moghaddam Et *al.*, 2018). Ces cellules jouent un rôle crucial dans les maladies infectieuses, auto-immunes et allergiques ainsi que dans l'homéostasie (Labonte, Tosello-Tramont, Et Hahn 2014).

L'interleukine-13 (IL-13) est une cytokine non glycosylée immunomodulatrice fortement sécrétée par les cellules T helper 2 (Th2), ainsi que par d'autres cellules. Il est exprimé par le gène *il-13* qui est localisé au niveau du chromosome 5 (Wang Et *al.*, 2018; Yuan 2019). Ce gène a été découvert pour la première fois dans le laboratoire du Docteur Mossman (Grünig Et *al.*, 2012). Grâce à leur positionnement rapproché, le gène *il-13* partage des ressemblances avec *il-4* (Grünig Et *al.*, 2012; Seyfizadeh Et *al.*, 2015). L'IL-13 est impliqué dans plusieurs pathologies, y compris les maladies inflammatoires (Tu Et *al.*, 2016). L'étude de l'expression de cette cytokine offrira de nouvelles pistes pour diagnostiquer et traiter les allergies.

La PCR est une technique largement utilisée dans plusieurs disciplines dont elle sert à sélectionner puis amplifier un fragment d'ADN en une très grande quantité d'ADN particulières. Ce processus se fait à travers un enchaînement des étapes bien déterminées incluant des acteurs génétiques (Kadri 2020). Le choix d'amorces est une étape primordiale dans la réussite de la PCR et l'étude de l'expression de n'importe quel gène.

Introduction

Dans cette d'ordre d'idée, cette étude a pour objectif de concevoir des amorces du gène IL-13 exprimé par macrophages M2 au cours de l'allergie.

Chapitre 1. Revue de la littérature

1. Hypersensibilité

1.1. Définition

Au cours des dernières décennies, l'allergie est devenue la première maladie chronique dans plusieurs régions du monde. Elle affecte jusqu'à 30% de la population de chaque pays (Jappe Et *al.*, 2019). Il s'agit d'une réaction d'hypersensibilité induite par des mécanismes immunologiques éprouvés ou fortement suspectés, dont elle est associée aux immunoglobulines E (IgE). Les déclencheurs de cette réaction sont des substances étrangères normalement inoffensives, appelées allergènes, que le sujet a été préalablement exposées et sensibilisées (Tanno Et *al.*, 2016).

L'allergie est un trouble fortement dépendant de plusieurs facteurs environnementaux tels que des sources d'allergènes, la composition du microbiote et aussi les infections parasitaires (Caraballo Et *al.*, 2016).

En 1869, Charles H. Blackley a démontré que le pollen était la cause apparente de son rhume des foins. De là, les progrès dans le domaine des allergies ont commencé, avec la mise en place d'une immunothérapie appliquant des extraits d'allergènes entiers comme une pratique courante dans les années 1970 (Figure 1.2). En 1980, seuls quelques allergènes avaient été identifiés, ce qui a obligé le développement d'une nomenclature systématique pour ces derniers. Il existe plusieurs sources d'allergènes, y compris le pollen, les acariens, les épithéliums et la salive des animaux, les champignons, les venins d'insectes et une variété d'aliments d'origine végétale et animale (Pomés Et *al.*, 2018).

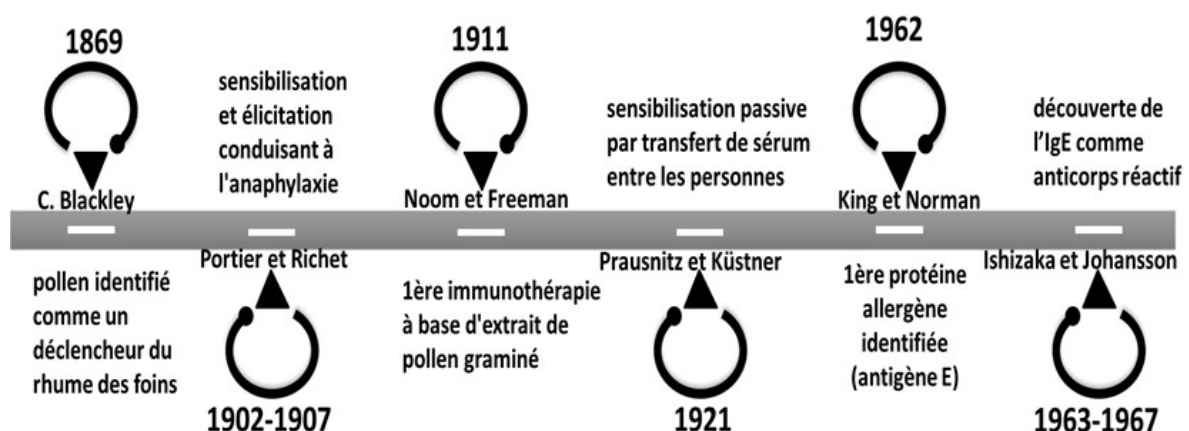


Figure 1.1. Les découvertes clés dans le domaine d'allergie (Pomés Et *al.*, 2018). Les chercheurs ont passé par différentes étapes afin de signaler l'IgE comme un anticorps réactif.

Chapitre 1. Revue de la littérature

Les allergènes sont des antigènes qui proviennent de nombreuses différentes sources entraînant l'apparition de symptômes d'allergie chez les personnes prédisposées via la stimulation du système immunitaire pour produire des IgE. Le déclenchement d'une réaction allergique est dû à la formation d'un complexe allergène-IgE. Ce complexe est responsable des maladies allergiques (Chruszcz Et *al.*, 2018). Ces dernières sont complexes et étendues en termes d'organes touchés et de gravité, comme la rhinite allergique, les allergies alimentaires, l'asthme, la conjonctivite, l'œdème de Quincke, l'urticaire, l'eczéma, les allergies aux insectes et l'anaphylaxie potentiellement mortelle (Sim, Abd Rani, Et Husain 2019). La compréhension de la nature des allergènes est nécessaire pour le diagnostic des allergies et l'immunothérapie. Actuellement, plus d'un millier de ces molécules ont été identifiées et enregistrées par le sous-comité de la nomenclature des allergènes de l'Organisation mondiale de santé et de l'Union internationale des sociétés d'immunologie (OMS / IUIS) (Zhang, Chen, Et Robinson 2018).

1.2. Types

Les réactions d'hypersensibilité sont généralement décrites comme une réaction exagérée du système immunitaire. Selon leur mécanisme d'action et les cellules impliquées, elles sont classées en quatre types distincts.

1.2.1. Hypersensibilité de type I (Allergie médiée par l'IgE)

1.2.1.1. Définition

L'allergie associée à l'IgE est la maladie d'hypersensibilité la plus fréquente. Elle touche environ 30% de la population mondiale. Elle s'agit de la production d'anticorps IgE et de réponses des lymphocytes T contre les allergènes induisant une inflammation chez les individus génétiquement prédisposés. Les patients allergiques présentent une variété de symptômes, tels que une rhinoconjonctivite, un asthme, une inflammation cutanée, des symptômes gastro-intestinaux et un choc allergique menaçant le pronostic vital (Eckl-Dorna Et *al.*, 2019).

1.2.1.2. Mécanisme immunitaire

En cas d'allergie, le système immunitaire réagit aux allergènes, tels que le pollen, les acariens et/ou les squames d'animaux en augmentant les réponses des lymphocytes T helper 2 (Th2) et la production des IgE par les cellules B via la stimulation par des cytokines telles que l'interleukine 4 (IL-4) et l'interleukine 13 (IL-13) (Jensen-Jarolim Et *al.* 2018).

Chapitre 1. Revue de la littérature

Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) captent les allergènes lorsqu'ils sont présents dans l'organisme et les présentent aux lymphocytes T CD4+ naïfs (TH0) *via* les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII) au niveau des ganglions lymphatiques. Après l'activation des lymphocytes T CD4+, elles se transforment en cellules Th2 spécifiques à l'allergène qui sont impliquées dans la production d'IgE. Ces cellules libèrent l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 pour initier la réponse immunitaire inflammatoire. Les cellules B sont stimulées par l'IL-4 pour se différencier en plasmocytes producteurs d'anticorps IgE, qui reconnaissent spécifiquement l'allergène. Les IgE se lient fortement aux récepteurs de haute affinité (FcεRI) exprimés à la surface des mastocytes et des basophiles conduisant à une séquence des réactions (Watts Et *al.*, 2019).

La phase précoce de la réaction est caractérisée par la dégranulation des mastocytes et la libération d'histamine. Cette réaction se développe quelques minutes suite à l'exposition à un allergène. La libération d'histamine avec les effets d'autres cytokines pro-inflammatoires puissantes (par exemples les leucotriènes) et les eicosanoïdes (par exemple les prostaglandines) augmentent également la perméabilité vasculaire, entraînant la formation d'un œdème. Tandis que, la réaction de la phase tardive, qui se développe plusieurs heures après l'exposition à l'allergène, est caractérisée par le recrutement des basophiles, des neutrophiles, des lymphocytes T, des monocytes et des éosinophiles et par la libération de plusieurs médiateurs, dont les cytokines, les prostaglandines et les leucotriènes, qui perpétuent la réponse inflammatoire. À la suite d'une inflammation des muqueuses, les tissus réagissent plus vigoureusement à l'exposition aux allergènes contribuant à l'hyperréactivité bronchique (Figure 1.3) (Bjermer Et *al.*, 2019).

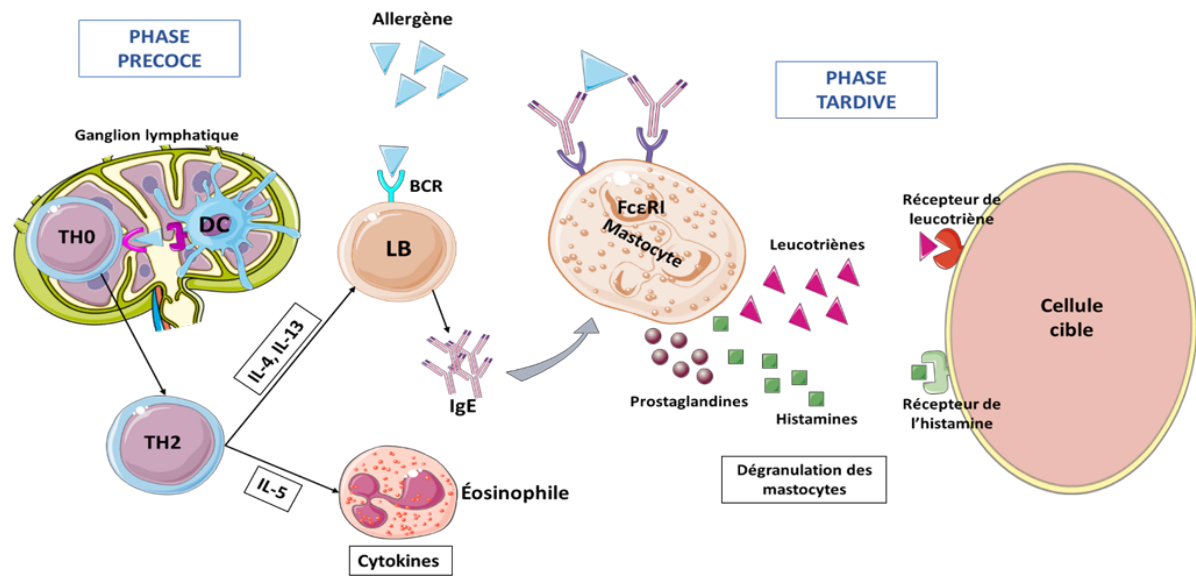


Figure 1.2. Processus physiopathologique de l'allergie médiée par les IgE (Bjerner Et al., 2019). Les deux phases de la réaction d'hypersensibilité de type I montrant les différents types des cellules immunitaires impliquées dans le déclenchement de l'inflammation allergique. BCR : Récepteur des cellules B, TH0 : Lymphocyte helper naïf, TH2 : Lymphocyte helper type 2, DC : Cellule dendritique, LB : Lymphocyte B, IL : Interleukine, IgE : immunoglobulines E, FcεRI : Récepteur de haute affinité pour la région Fc de l'immunoglobuline E.

1.2.2. Hypersensibilité de type II

1.2.2.1. Définition

Les chercheurs ont considéré les réactions d'hypersensibilité de type II comme des réactions semi-retardées spécifiques à l'antigène dont ils incluent une cytotoxicité à médiation IgM / IgG de diverses cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques. Les médicaments peuvent être la cause de ces réactions en entraînant une anémie, une thrombopénie, une neutropénie ou une hépatite (Viel Et al., 2018).

1.2.2.2. Mécanisme immunitaire

Les réponses d'hypersensibilité de type II sont déclenchées par la génération des immunoglobulines spécifiques contre les allergènes liés aux protéines membranaires pendant la phase de sensibilisation (Viel Et al., 2018). Ces anticorps ont le pouvoir d'activer la lyse dépendante du complément, ce qui provoque des lésions au niveau des tissus. Dans cette réaction cytotoxique, l'anticorps réagit directement à l'antigène qui est adsorbé à la membrane cellulaire dans le but d'activer la lyse cellulaire induite par le système du complément. Les antigènes lançant ce type d'hypersensibilité pourraient être du «soi» donc on parle de réactions auto-immunes, comme ils pourraient être aussi du «non-soi».

L'incompatibilité rhésus foëto-maternelle est considérée comme l'un des meilleurs exemples de réactions cytotoxiques (Shibani Basu, s. d.).

1.2.3. Hypersensibilité de type III

1.2.3.1. Définition

Les réactions d'hypersensibilité de type III sont décrites par la formation de complexes anticorps/antigènes. Ces derniers provoquent une réponse inflammatoire locale en se déposant dans les tissus et les petits vaisseaux sanguins. Ces réaction de type III peuvent induire une maladie sérique (Kanji Et Chant 2010; Powell, Thompson, Et Murtaugh 2013).

1.2.3.2. Mécanisme immunitaire

Les complexes formés lors de la réponse immunitaire de type III induisent l'activation de la cascade du complément et cela provoque une inflammation et une destruction tissulaire. Les changements réalisés touchent les artérioles, les veinules et les capillaires, et les constatations histopathologiques se résument dans un gonflement des cellules endothéliales, des infiltrats inflammatoires dans les vaisseaux et le tissu conjonctif adjacent (principalement des neutrophiles), une caryorrhexie des neutrophiles et une extravasation des globules rouges (Powell, Thompson, Et Murtaugh 2013).

1.2.4. Hypersensibilité de type IV ou retardé

1.2.4.1. Définition

La réaction d'hypersensibilité de type IV ou retardée (DTH) s'installe 24 heures après la rencontre avec l'allergène. Cette réaction implique des réponses à médiation cellulaire par l'activation directe des lymphocytes T qui peuvent induire la libération des cytokines attirant les macrophages et les lymphocytes effecteurs qui peuvent endommager les cellules cibles. La DTH se voit au cours d'infections bactériennes comme la tuberculose (Kay 2008)

1.2.4.2. Mécanisme immunitaire

L'une des formes les plus courantes de la DTH est l'hypersensibilité cutanée provenant de bijoux. Cette hypersensibilité est généralement décrite comme une réaction locale dans laquelle un allergène est reconnu par les CPA et présenté aux cellules Th1 *via* la molécule du CMH-II, ce qui conduit à une réponse pro-inflammatoire appropriée (Ort Et *al.*, 2019). Les substances sensibilisantes peuvent réagir avec des auto-protéines et former des complexes haptène-protéine qui se lient aux molécules du CMH et activent les cellules T comme un antigène étranger

régulier (par exemple, à partir de bactéries). La réaction est divisée en deux phases : sensibilisation et provocation. Lors de la sensibilisation, les CPA abritent des organes lymphoïdes secondaires et activent les lymphocytes T, qui libèrent à leur tour des cytokines pour attirer les macrophages vers le site d'exposition aux allergènes entraînant une lésion tissulaire (la phase de provocation) (Figure 1.4) (McKee Et Fontenot 2016).

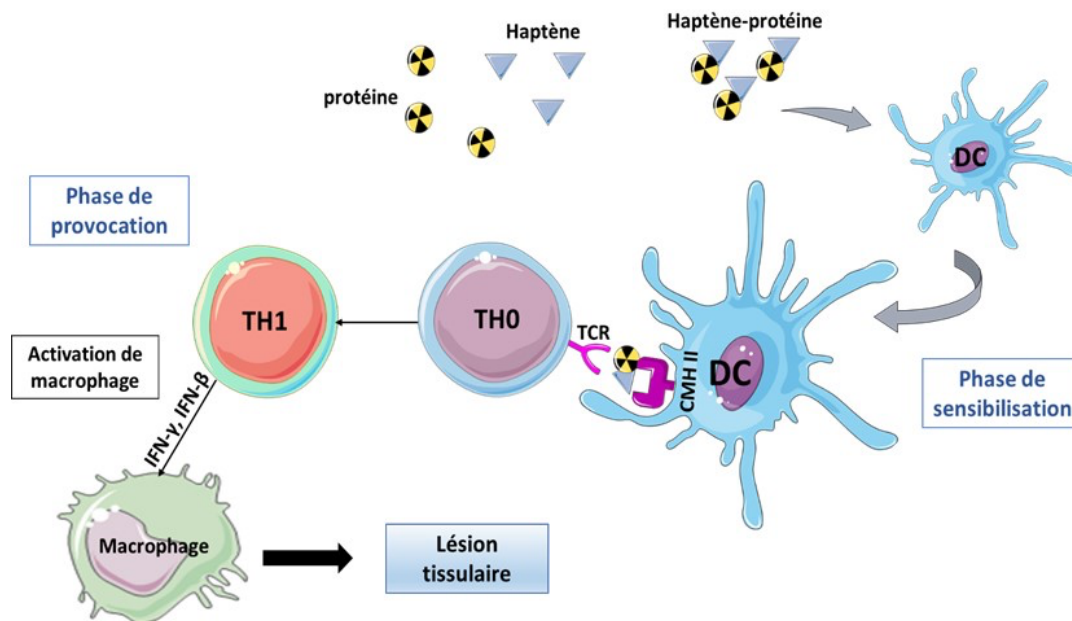


Figure 1.3. Processus physiopathologique de la réaction d'hypersensibilité de type IV (Ort Et al., 2019). Les deux phases de la réaction d'hypersensibilité de contact expliquant le mécanisme menant à des lésions tissulaires par la captation d'un haptène conjugué avec une protéine. TH1 : Lymphocyte helper type 1, TH0 : Lymphocyte helper naïf, TCR : Récepteur de lymphocyte T, DC : cellule dendritique, CMH II : Complexe majeur d'histocompatibilité.

1.3. Etiologie

Les symptômes de l'hypersensibilité peuvent être identifiés par la reconnaissance de la voie d'exposition à l'antigène. Par exemple, la voie naturelle d'exposition au pollen, aux squames animales et aux spores fongiques est l'inhalation, donc le résultat clinique attendu est la conjonctivite rhinocéros ou l'asthme. En outre, les allergènes alimentaires sont liés à des symptômes objectifs de syndrome d'allergie orale, d'œdème de Quincke du larynx, de symptômes du tractus gastro-intestinal ou de symptômes systémiques tels que l'urticaire, l'asthme ou l'anaphylaxie après consommation de l'aliment (Matricardi Et al., 2016). L'inclusion de l'urticaire plus l'œdème de Quincke ainsi que d'autres réactions systémiques sont à l'origine d'une piqûre d'insecte. Après ingestion d'allergènes des symptômes cutanés sont assez courants, et il en va de même pour les

symptômes respiratoires. Mais, des exceptions s'existent toujours (Pomés Et *al.*, 2018).

2. Macrophages

2.1. Définition

Les macrophages sont des cellules immunitaires qui appartiennent aux leucocytes. Ils se définissent par leurs phénotypes, morphologie, localisation et leurs profils d'expression génique (Sica Et *al.*, 2015; Wynn, Chawla, Et Pollard 2013). Elie Metchnikoff a identifié pour la première fois en 1893 ces cellules comme des cellules phagocytaires qui ont un rôle dans l'élimination des agents pathogènes chez les vertébrés et les invertébrés (Labonte, Tosello-Tramont, Et Hahn 2014).

2.2. Origine

Des études nouvelles ont justifié et montré que la plupart des macrophages qui résident dans les tissus sont ensemencés dès la phase embryonnaire de l'être humain. Ils sont dérivés du sac vitellin lors du développement embryonnaire. Ces cellules sont caractérisées par leur auto-renouvellement et sont maintenues indépendamment des monocytes (Hashimoto Et *al.*, 2013; Davies Et *al.*, 2013; Epelman, Lavine, Et Randolph 2014). Cependant, Les macrophages tissulaires nouvellement recrutés dans les infections, les tumeurs et les inflammations allergiques sont principalement d'origine de la différenciation des monocytes (Figure 1.4) (Gordon et Martinez 2010).

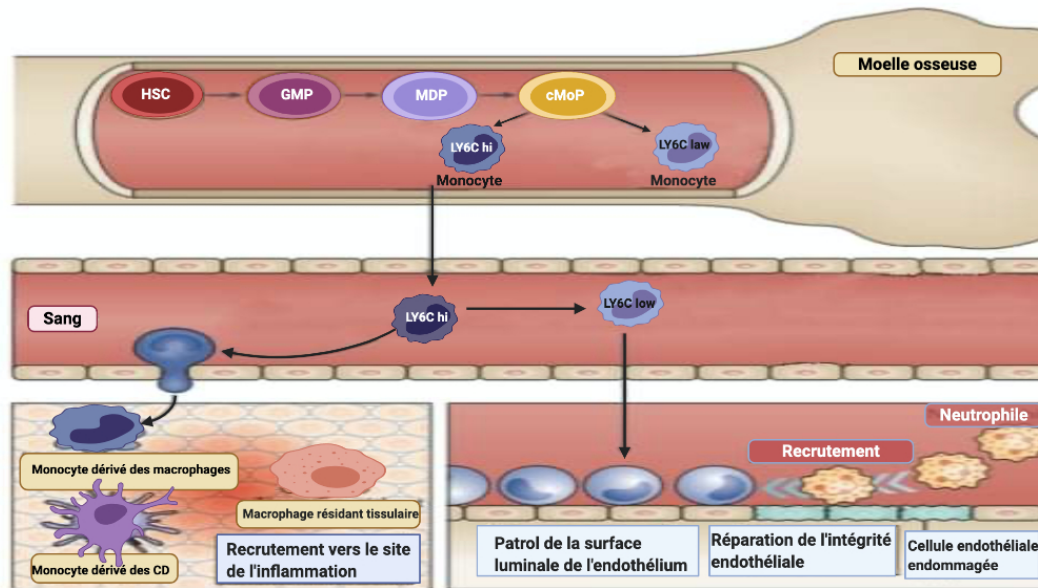


Figure 1.4. Origine des macrophages (Ginhoux Et Jung 2014). Les monocytes sont générés en continuité dans la moelle osseuse à partir de CSH via des MDP cMoP. À l'état d'équilibre, les sous-ensembles de monocytes LY6Chi et LY6Clow dans la circulation forment un continuum de développement mais sont fonctionnellement distincts. HSC: cellules souches hématopoïétiques, MDP : précurseur des macrophages et des cellules dendritiques, GMP : progéniteur des granulocytes – macrophages, cMoP : progéniteurs communs de monocytes.

2.3. Phénotypes

Les études sur les macrophages ont prouvé qu'il existe plusieurs sous-populations de ces cellules chez l'homme. Cette classification se base sur l'activité biologique, la production des facteurs spécifiques et l'expression de marqueurs de surface. L'environnement cytokinique est considéré comme l'un des principaux facteurs qui entraînent la polarisation de ces cellules vers deux chemins différents, les macrophage classiquement activés ou pro-inflammatoires (M1) et les macrophages alternativement activés ou anti-inflammatoires (M2) (Murray Et *al.*, 2014; Sica Et *al.*, 2015).

2.3.1. Macrophages M1

Les macrophages M1 sont induits par des cytokines secrétées par les Th1, telles que l'interféron-gamma (IFN- γ) et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α), ou par reconnaissance de lipopolysaccharides bactériens (LPS). Ces macrophages produisent des taux plus élevés de cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 et cyclooxygénase-2 (COX-2), et de faibles taux d'IL-10. Fonctionnellement, les macrophages M1 participent à l'élimination des agents pathogènes lors de l'infection par l'activation du système de nicotinamide

Chapitre 1. Revue de la littérature

adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase et la génération subséquente d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Particulièrement, les macrophage M1 ont une activité antimicrobienne et antitumorale et interviennent dans les lésions tissulaires induites par les ROS (Shapouri-Moghaddam Et *al.* 2018)

2.3.2. Macrophages M2

Les macrophages se polarisent vers un profil M2 sous l'action des cytokines de type Th2, telles que l'IL-4 et l'IL-13 par l'activation de STAT6 via le récepteur alpha de l'IL-4 (IL-4R α). Ces cytokines et d'autres telles que l'IL-10 peuvent aussi induire la polarisation vers le profil M2 en activant STAT3 via le récepteur de l'IL-10 (IL-10R). De plus, Les cytokines l'IL-33 et l'IL-21 sont également incluses pour effectuer le même processus. Les macrophages M2 se caractérise par une faible production d'IL-12 et une production élevée d'IL-10 et de TGF- β . Ils ont une forte capacité de phagocytose, récupèrent les débris et les cellules apoptotiques, favorisent la réparation des tissus et la cicatrisation des plaies, et possèdent des propriétés pro-angiogéniques et pro-fibriques (Shapouri-Moghaddam Et *al.*, 2018).

2.4. Rôle

Les macrophages représentent une population ubiquitaire et complexe des cellules du système immunitaire qui ont un rôle indispensable dans les maladies et l'homéostasie (Labonte, Tosello-Tramont, Et Hahn 2014). Ils sont considérés comme la première ligne de défense immunitaire dans l'organisme, à l'aide de ses divers récepteurs (Gordon Et Martinez 2010). Ces cellules induisent des réponses immunitaires antivirales et antibactériennes très efficaces dont ils ont une forte capacité cytotoxique contre les cellules infectées et assurent la résistance aux infections. Ils participent aussi dans les maladies auto-immunes dont ils sont considérés comme une source importante de nombreuses cytokines inflammatoires qui ont été identifiées comme des médiateurs importants de l'inflammation chronique et des maladies auto-immunes (Shapouri-Moghaddam Et *al.*, 2018).

En outre, les macrophages associés aux tumeurs (TAM) sont les principaux leucocytes infiltrant du microenvironnement tumoral (Shapouri-Moghaddam Et *al.*, 2018).

Les macrophages ont un rôle important dans les mécanismes des réactions d'hypersensibilité humorale et cellulaire dans plusieurs phases de la réponse immunitaire. En tant que CPA professionnel, les macrophages ont le pouvoir d'induire la réponse d'un auxiliaire T CD4 + spécifique à un allergène. En tant que

phagocytes professionnels efficaces, les macrophages contribuent à l'élimination des allergènes, principalement dans les voies respiratoires (Nazimek Et *al.*, 2013).

3. Interleukine -13

3.1. Gène IL-13

L'IL-13 est une cytokine anti-inflammatoire immunomodulatrice (Mori, Maher, Et Conti 2016, 4). C'est un produit protéique pléiotrope exprimé par le gène *il-13* et fortement secrété par des cellules Th2 (de Vries 1998; Minty Et *al.*, 1997).

Le gène *il-13* a été initialement reconnu par la dénomination « p600 ». La découverte de ce gène a été pour la première fois en 1993 au niveau de laboratoire du Docteur Mossman, ce dernier est crédité de la découverte, pour la première fois, les cellules Th1 et Th2 avec son collègue docteur coffman (Grünig Et *al.*, 2012). Ce gène a un emplacement cytogénétique : 5q23.31; cela est le bras long (q) au niveau du chromosome 5 à la position 23.31 (Figure 1.5) (Wang Et *al.*, 2018; Yuan 2019). Il est dans le même groupe de gènes de 3000 kb qui code pour l'IL-3, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9 et le facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF) (Wynn 2003b).

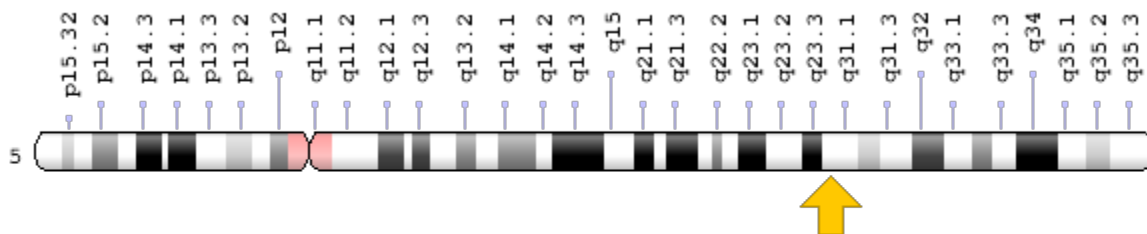


Figure 1.5. Localisation du gène IL13 sur le chromosome 5 humain (d'après NCBI).

Le gène IL-13 est situé très proche du locus du gène IL-4, donc les 2 gènes partagent 25% d'homologie entre eux dont ils sont transcrits dans le sens inverse de tous les gènes voisins, ainsi que la forte ressemblance dans la structure primaire, secondaire et tertiaire après l'expression de leurs protéines (Grünig Et *al.*, 2012; Seyfizadeh Et *al.*, 2015).

3.2. Protéine IL-13

L'IL-13 (Figure 1.6) est sécrétée sous la forme d'un produit non glycosylée de 10 kd par les cellules Th2 activées (Seyfizadeh Et *al.*, 2015), ainsi que par les basophiles, les éosinophiles, les mastocytes, les cellules naturel killer (NK) et les cellules naturel killer T (NKT) (Price Et *al.*, 2010; Rael Et Lockey 2011). Cette

cytokine est un produit peptidique à 33 acides aminés qui se replie en 4 faisceaux hélicoïdaux alpha, sa transcription est régulée par le facteur de transcription spécifique des cellules T (GATA3) (Yuan 2019; Rael Et Lockey 2011).

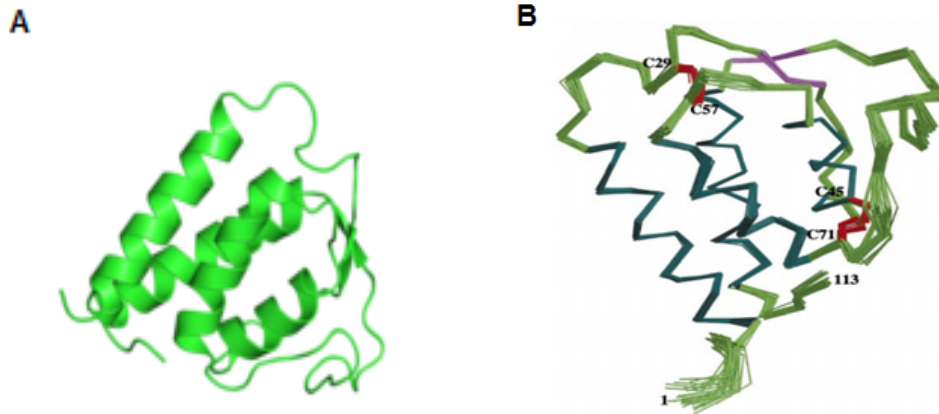


Figure 1.6. (A et B) : structure en 3D d'IL-13 (F. J. Moy Et *al.*, 2001).

3.3. Structure

L'IL-13 est composé de 4 faisceau hydrophobe α -hélicoïdal qui est une indication de la classe des cytokines de type I. La (figure 1.7) montre la topologie globale haut-bas-bas de cette cytokine dont les quatre régions hélicoïdales se liées par trois boucles, c'est-à-dire A, B, C et D ensemble, et une liaison disulfure relie la boucle AB à la boucle BC (Seyfizadeh Et *al.*, 2015).

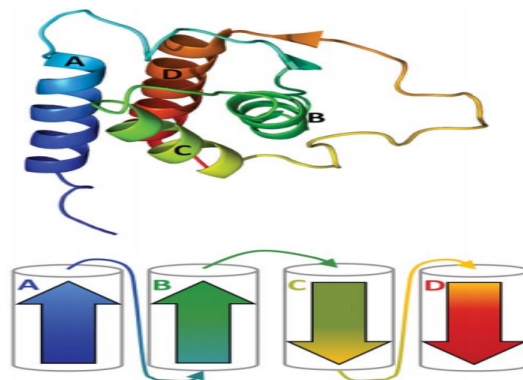


Figure 1.7. Représentation de la topologie globale haut-bas-bas de l'IL-13 (Seyfizadeh Et *al.*, 2015).

3.4. Rôle

L'IL-13 a été initialement décrite comme une cytokine anti-inflammatoire qui inhibe la production de cytokines inflammatoires, mais malgré cette description originale, les fonctions d'IL-13 se sont bien développées ces dernières années (Wynn 2003a) dont ils ont trouvé qu'il déclenche à la fois des réponses immunitaires pro-inflammatoires et anti-inflammatoires (Eisenmesser Et *al.*, 2001).

IL-13 a reçu récemment beaucoup d'attention puisque les chercheurs ont découvert que cette cytokine est incluse dans différentes maladies inflammatoires telles que les maladies auto-immunes, la colite ulcéreuse et l'asthme pulmonaire et est associée avec beaucoup tumeurs malignes (Tu Et *al.*, 2016).

Les fonctions effectrices médiées par l'IL-13 se résument dans l'hyperréactivité des voies respiratoires, la régulation de l'expulsion des parasites gastro-intestinaux, l'allergie, la production d'anticorps IgE, la mastocytose, éosinophilie tissulaire, l'hyperplasie des cellules caliciformes et la croissance des cellules tumorales (Wynn 2003a).

En outre, l'IL-13 a un rôle important sur les fibroblastes, en induisant l'expression des intégrines, la périostine et la prolifération. Elle a aussi des fonctions diverses sur les cellules non immunitaires en induisant la production d'éotaxine (Seyfizadeh Et *al.*, 2015).

3.5. Signalisation

L'IL-13 partage avec l'IL-4 un récepteur multi-sous-unités où la signalisation commence (Figure 1.8). Le récepteur est un complexe hétérodimère constitué de 2 unités ; le récepteur alpha IL-4 (IL-4R α) et le récepteur alpha IL-13 (IL-13R α 1). Grâce à l'affinité élevée entre l'IL-13 et son récepteur IL-13R α 1, il y aura la formation d'une liaison entre eux, cela va augmenter la probabilité de l'hétérodimérisation. Cette hétérodimérisation sera la clé pour l'activation à la fois du STAT6 et de « Insulin receptor substrate » (IRS) (Rael Et Lockey 2011). La formation de l'hétérodimère induit la phosphorylation de STAT6 par la famille Janus kinase (JAK1, JAK2, TYK2) et la formation d'un homodimère activé. Ce dernier sera transporté vers le noyau (Franklin J Moy Et *al.*, 2001; Rael Et Lockey 2011). Dans le noyau, l'hétérodimère STAT6 activé joue un rôle important dans la régulation de l'expression des molécules nécessaires pour l'équilibre entre la défense contre les infections et les réponses inflammatoires allergiques notamment le développement des Th2 (Figure 1.8) (Walford Et Doherty 2013).

L'IL-13 a la capacité de se lier avec un autre récepteur connu par IL-13R α 2, qui est considéré comme récepteur leurre et est dérivé des cellules Th2. L'affinité d'IL-13 avec IL-13R α 2 est 50 fois plus importante qu'avec IL-13R α 1. IL-13R α 2 se lie sauf avec IL-13 (Tu Et *al.*, 2016)

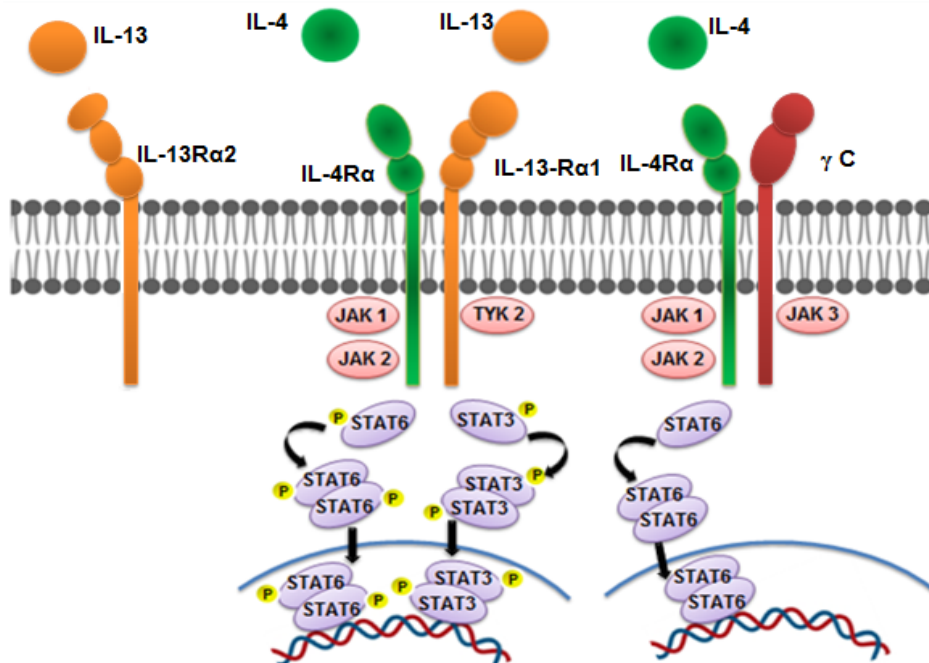


Figure 1.8. Schéma représente la signalisation IL-13 et IL-4 (Marone Et *al.*, 2019). IL : Interleukine, IL-R α : Récepteur alpha de l'interleukine, JAK : Janus kinase, STAT : Transducteur de signal et l'activateur de la transcription, P : Phosphore, γ C : Chaîne gamma.

3.6. Polymorphisme

Les variants polymorphes dans le gène de l'IL-13 ont été prouvés pour avoir une liaison avec une activité de transcription plus élevée du gène. Cela induit une synthèse élevée de l'IL-13 ainsi que le développement de troubles allergiques et inflammatoires. L'analyse du polymorphisme de -1055C / T IL-13 démontre une association entre la survenue d'un allèle T et une expression accrue d'IL-13, des taux sériques élevés d'IgE, l'asthme, l'atopie et l'eczéma. Deux autres polymorphes localisés dans les régions + 2044G / A et + 1923C / T, ont été associés à une production élevée d'IL-13 (Lesiak Et *al.*, 2011).

3.7. IL-13 et allergie

En condition physiologique, après qu'elles phagocytent de l'allergène, les macrophages tissulaires migrent vers le ganglion lymphatique local dans le but d'inhiber l'activation des cellules dendritiques et empêcher le développement d'une réponse spécifique à l'allergène (Murray Et Wynn 2011). D'autre part, ils sont

Chapitre 1. Revue de la littérature

activés au site de l'inflammation dépendante de Th2 par IL-4 et IL-13, et sécrètent l'IL-13 qui stimule la différenciation des lymphocytes Th2 et l'éotaxine pour recruter les éosinophiles. Les deux mécanismes provoquent finalement la réaction d'hypersensibilité (Nagarkar Et *al.*, 2010). Pour se différencier en M2 par l'IL-13, les macrophages dépendent de l'induction de STAT6, ce qui conduit à l'activation de facteurs profibrotiques. Ces macrophages M2 humains ont une activité phagocytaire accrue, mais ils sont incapables de supprimer les agents pathogènes intracellulaires (Moreira Et Hogaboam 2011).

L'IL-13 peut contribuer à la principale manifestation physiologique de l'asthme et l'hyperréactivité des voies aériennes en induisant plusieurs changements cellulaires dans la paroi des voies respiratoires. On peut résumer ces changements dans la métaplasie des cellules muqueuses et la production de mucus, la contraction des muscles lisses des voies respiratoires et l'induction du dépôt de collagène et fibrose (Munitz Et *al.*, 2008). Grâce à la médiation de STAT6, l'IL-13 stimule un certain nombre de gènes épithéliaux, dont MUC5AC et la périostine, qui se sont avérés provoquer une obstruction du mucus des voies respiratoires et une hyperréponse des voies aériennes. Cette cytokine augmente également la sensibilité des muscles lisses des voies aériennes à quelques agonistes contractiles tels que l'acétylcholine, l'histamine et cystéinyl leucotriènes (Sheikh et al. 2015, 4). Enfin, la formation d'arginase I dans des macrophages alternativement activés et la production de cellules épithéliales et de monocytes de TGF- β induisent la production de collagène à partir de fibroblastes conduisant à un raidissement de la paroi des voies respiratoires (Bhattacharjee Et *al.*, 2013)

La plupart des arguments soutiennent toujours le rôle principal pour l'IL-13 dans les troubles allergiques. Les chercheurs maintenant tournent leurs attentions vers la compréhension des mécanismes par lesquels cette cytokine a la capacité à médier les caractéristiques physiopathologiques des maladies allergiques. Le modèle émergent est que l'IL-13 induit des propriétés de réponse allergique via un ensemble complexe de procédures sur les cellules des voies respiratoires résidentes (Gour Et Wills-Karp 2015).

4. PCR

4.1. Définition

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) est une simple technique qui a été découverte par Dr Kary Mullis (Mullis 1990). C'est un test enzymatique dans lequel de petites quantités d'ADN peuvent être amplifiées en plusieurs copies. On peut l'effectuer par l'utilisation de l'ADN source d'une variété de tissus et d'organismes comme la peau, les cheveux, le sang périphérique, la salive et les microbes (Garibyan Et Avashia 2013).

4.2. Acteurs de la PCR

La PCR nécessite la présence d'ADN matrice, d'amorces, de nucléotides et d'ADN polymérase pour chaque essai. L'ADN polymérase est l'enzyme clé pour relier les nucléotides ensemble pour composer et donner le produit de PCR. Les nucléotides sont les composants de construction qui sont utilisés par l'ADN polymérase pour former le produit de PCR résultant. Le rôle des amorces dans la réaction est de spécifier le produit d'ADN à amplifier. Ce sont de fragments d'ADN courts avec une séquence connue complémentaire à l'ADN à détecter et à amplifier. Elle agissent comme un point d'extension sur lequel l'ADN polymérase peut travailler (Garibyan Et Avashia 2013).

4.3. Étapes de la PCR

Pour effectuer ce processus, les composants cités ci-dessus soient mélangés dans un tube à essai ou une plaque à 96 puits avant qu'ils soient placés dans un thermocycleur qui permet la production des cycles répétés d'amplification d'ADN en trois étapes de base (Figure 1.9). Le thermocycleur augmente et abaisse la température en étapes séparées, précises et préprogrammées. Le chauffage de la solution de réaction jusqu'à 90°C pendant 30 seconds provoque la dénaturation et la séparation des brins d'ADN, et l'abaissement ensuite environ 50°C permet l'hybridation entre les amorces spécifiques et les segments d'ADN cibles. L'augmentation de la température à nouveau rend l'ADN polymérase capable d'étendre les amorces par l'ajoute des nucléotides au brin d'ADN en développement. Le nombre de molécules d'ADN copiées double pour chaque répétition de ces trois étapes (Garibyan Et Avashia 2013).

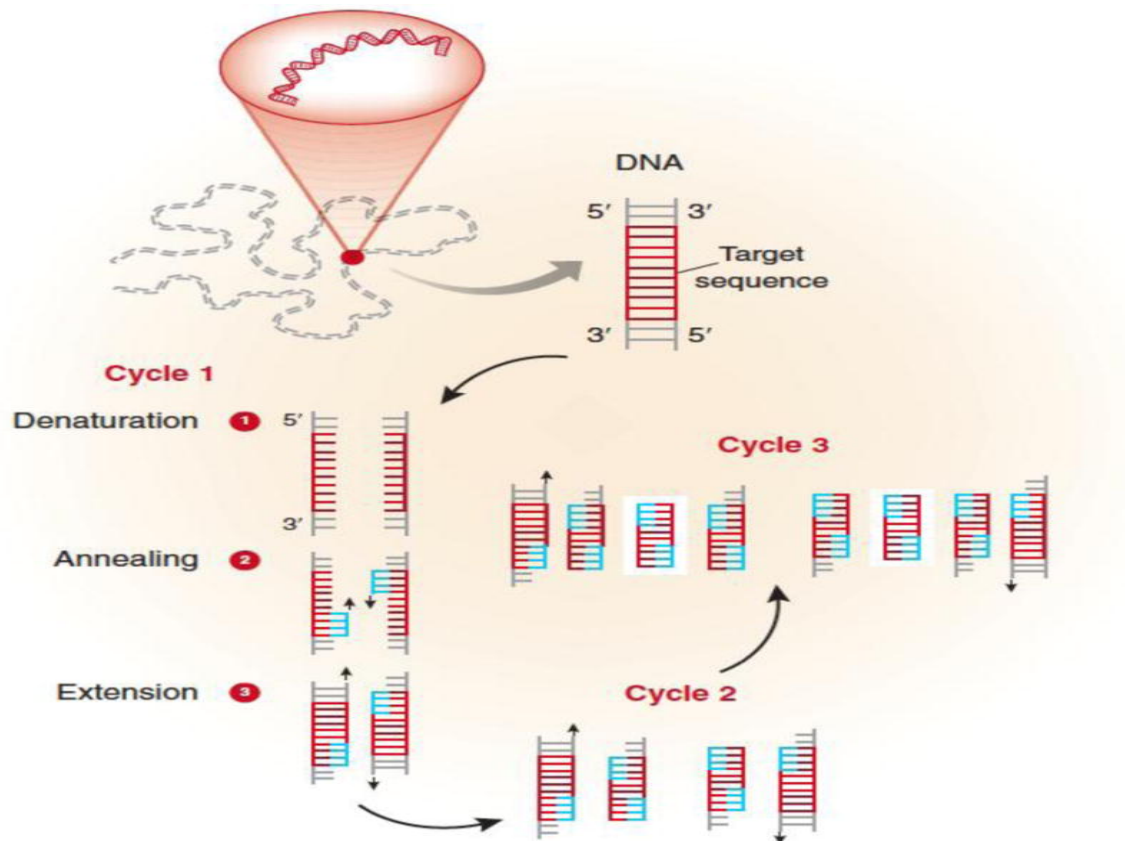


Figure 1.9. Schéma représente les étapes de la PCR (Garibyan Et Avashia 2013). DNA : Acide Désoxyribonucléique

4.4. Types de PCR

4.4.1. PCR qualitative

Lorsqu'on utilise la PCR pour la détection de la présence ou l'absence d'un produit d'ADN spécifique, on l'appelle PCR qualitative. Ce type soit utilisé lorsque la PCR est effectuée à des fins de clonage ou pour l'identification d'un pathogène (Garibyan Et Avashia 2013).

4.4.2. PCR quantitative

Ce type de PCR est pour but d'indiquer la quantité d'un ADN ou d'un gène spécifique présent dans l'échantillon. Il a été développé dans les années 80. La PCR quantitative est caractérisée par la détection et la quantification du produit de PCR en temps réel, lors de sa synthèse (VanGuilder, Vrana, Et Freeman 2008). Cette opération se fonctionne par la détection d'un signal fluorescent qui est généré de manière proportionnelle à l'amplification du produit PCR. Le thermocycleur associé à un système de lecture optique qui a le rôle de mesurer l'émission de

fluorescence, il est très important qu'il soit présent dans cette méthode (Kadri 2020).

5. Problématique

L'allergie est considérée comme la première maladie chronique dans plusieurs régions du monde. Le corps humain est toujours exposé à des sources allergènes qui vont stimuler dès leurs rentrer le système immunitaire pour réagir contre ces substances à travers ses cellules. Parmi ces cellules, les macrophages et précisément les macrophages M2, sont les plus répons dans les réactions d'hypersensibilités. La polarisation des macrophages vers ce profil est induite par l'IL-13 sécrété par les macrophages eux-mêmes et par d'autres cellules qui expriment le gène IL-13.

5.1. Objectif

L'objectif de ce travail consiste à concevoir des amorces spécifiques au gène IL-13 exprimé par le macrophage M2 au cours de l'allergie.

5.2. But

Etudier la relation entre l'expression de l'IL-13 et le rôle du macrophage M2 en cas d'allergie par les techniques de biologie moléculaire, notamment la PCR.

Chapitre 2. Matériel et méthodes

2.1. Conception d'amorces

La conception d'amorces est un processus essentiel pour la réussite d'une technique PCR. Ces amorces déterminent la sensibilité, la spécificité et la robustesse de cette technique. Une mauvaise conception des amorces peut empêcher la réussite de la PCR (Bustin, Mueller, et Nolan 2020).

Une amorce doit être orientée durant la conception dans le sens 5'→3' et le brin d'amorce complémentaire dans l'autre sens 3'→5' (Albert et Fenyö 1990).

2.2. Critères de sélection d'amorce

Plusieurs paramètres doivent être respectés lors du choix d'amorces. Les plus importants sont les suivants :

2.3. La longueur de l'amorce

L'importance de ce facteur est cruciale pour un test PCR réussi, car la longueur optimale de l'amorce augmente l'efficacité d'hybridation. Cette longueur optimale est généralement entre 16 et 28 nucléotides, en prenant en compte une différence de longueur qui ne dépasse pas 3 nucléotides entre les 2 amorces directe et inverse (Wu et *al.*, 2004).

2.4. La température de fusion

Pour que les résultats soit parfaits, la température de fusion doit être comprise entre 50 et 62 °C. La différence de température ne doit pas dépasser 5 °C entre les deux amorces.

2.5. La spécificité

Ce paramètre joue un rôle fondamental dans la sélection d'amorces dont plus l'amorce est spécifique plus la possibilité d'erreurs dans les résultats est faible. La spécificité peut être affectée par une gamme de facteurs comme la longueur et la pureté de l'amorce, la quantité d'enzyme dans la réaction, la température de recuit et d'autres additifs (Zhong et *al.*, 2016).

2.6. La complémentarité

La conception des amorces doit être absolument sans aucune homologie intra-amorce ou inter-amorce et ceci pour empêcher la formation des structures secondaires appelées épingles à cheveux (BELAID Nadia 2017, 3).

2.7. Teneur en G/C

Ce facteur sert à choisir l'amorce de telle sorte qu'il n'y ait aucune suite poly-G ou poly-C pouvant promouvoir une hybridation non spécifique. La teneur en CG doit être comprise entre 40% à 60% en G/C (Chuang, Cheng, et Yang 2013).

2.8. La séquence à l'extrémité 3'

La position terminale 3' présente des résidus GC qui sont plus thermodynamiquement que les bases AT et qui assurent une meilleure fixation, ces caractéristiques rendent la position mentionnée essentielle pour contrôler le désamorçage.

2.3. La séquence du gène IL-13

La première étape dans la conception des amorces est d'extraire la séquence du gène IL-13 à partir la base de données « Ensembl » via le site www.Ensembl.org (Fig 2.1).

The screenshot shows the Ensembl genome browser interface for the gene IL13. The left sidebar contains a navigation menu with 'Sequence' highlighted. The main content area displays the gene name 'Gene: IL13', its description as 'interleukin 13', and its location on 'Chromosome 5: 132,656,263-132,661,110'. Below this, there are buttons for 'Download sequence' and 'BLAST this sequence'. A 'Marked-up sequence' section shows a DNA sequence with exons highlighted in yellow. The sequence starts with 'TGCATTCTGTAACCTTTCTAAAAATAAAAAATCTAAAAAATAAAATCCTTTTCACCTTACAAA'.

Figure 2.1. Base de données « Ensembl »

Chapitre 2. Matériel et méthodes

Ensuite, la séquence extraite est copiée et collée dans un document Word. Il faut également choisir l'exon le plus approprié. Dans notre cas, cela est l'exon 1, cette étape est indiquée dans la figure 2.2.

```
CCGGAGCGGCCCTTTGGTAGTTAGTGTAAATTAATAATTAACCGCACGGGAGTGGATCCCC
GCTGACAATCTAGAAACAAGCAACAGACCCTCTGATGTAGCCATCTGTGCCGCGOCTCTC
CGCACCGCCCGCCACGCCCTTGGTCCCTGGAGACCACCTCCAGGGCAGGGGCTGCCGCTC
GGCCGGGCCCGCGGGGTCCCTCGGCCTGACATGGCCGGTGTGGAGCGGCACGTGCCGCGC
CTCGGCCCTCGGCCGCTCCGCCCTCGCCGGTGCACACCGCGCTCGGGGAGCCGCTG
GCCCCGGTGTCCAGCCGGCCCTTGCCCTGCCCTGGCGCTCGGACCGCCACCTTTGCCGCC
CCTCGCCAGCTCCGAGCTTCCAGACTGGCCGGTCTGGCCGCCACCCCTGCCGCCGG
ACCGGCCACCGCCGAGGCGCGGAGGAGGGCCCGCCGCGCAGATCCCGCTTATCGGGC
CCATCTCCGTTACATAAGGCCACCCCTATCTCCGCGGCCATCGCCGCGCAACCGC
CGGCCAGCGCTTCTCCACGCGCGGGGGCCGCCCTGCCACCGCTCCCGGCAGGGCTT
TTGGTGGCCATGGGGGATAAGGGGCGTTGACTCACCGGGCGGGCTCCGGGAGTTGCAC
AGACCAAGGTAGTTCCCGCTCCTTCCCCATCACGAGACCCTGTGGGAGATGCCGTGG
GCCCTCTACTACAGATTAGGAAACAGGCCCGTAGAGGGGTACACGGCCAAGTAGCGGCA
CTCCAGGCACTGGGGGCCCTCGAGGGGAAGGGCAGACTTCTGGGAGTCAGAGCCAGCAG
CTGGGCTGGGAAGCTTCGAGTGTGGACAGAGAGGGTGGGAATGACGTTCCCTGTGGGAAG
AGAGGGTGGGCAAGCCTGGGATGCCTCTGAGCGGGAATCCAGCATGCCTTGTGAGGAGGG
TCACAAGCACACCCTTGTGAGGAGGTTGAGCCCAICGAGGACAGGACGGAGGGAGCCTG
```

Figure 2.2. La séquence encadrée du gène IL-13 (l'exon 1)

2.4. L'outil Primer-blast

L'étape suivante sert à concevoir l'amorce spécifique du gène IL-13 en utilisant le logiciel Primer blast à l'aide de National Center for Biotechnology Information (NCBI) dans le site « www.ncbi.nlm.nih.gov » (Fig 2.3).

Chapitre 2. Matériel et méthodes

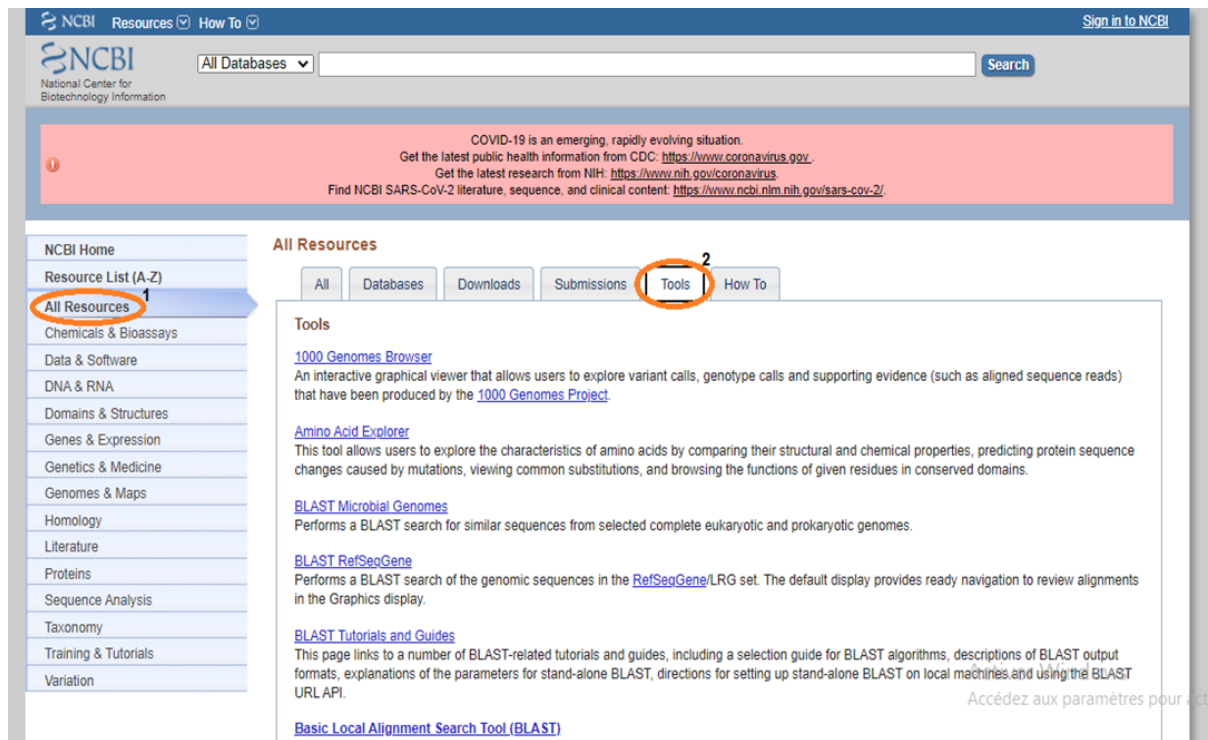


Figure 2.3. Site NCBI

Afin de concevoir les amorces par le Primer blast, il faut suivre les étapes et les figures ci-dessous. D'abord, il faut choisir l'outil Primer-blast (Fig 2.4).

[Open Reading Frame Finder \(ORF Finder\)](#)
A graphical analysis tool that finds all open reading frames in a user's sequence or in a sequence already in the database. Sixteen different genetic codes can be used. The deduced amino acid sequence can be saved in various formats and searched against protein databases using BLAST.

[PSSM Viewer](#)
Allows users to display, sort, subset and download position-specific score matrices (PSSMs) either from CDD records or from Position Specific Iterated (PSI)-BLAST protein searches. The tool also can align a query protein to the PSSM and highlight positions of high conservation.

[Phenotype-Genotype Integrator \(PheGenI\)](#)
Supports finding human phenotype/genotype relationships with queries by phenotype, chromosome location, gene, and SNP identifiers. Currently includes information from dbGaP, the NHGRI GWAS Catalog, and GTEx. Displays results on the genome, on sequence, or in tables for download.

3
[Primer-BLAST](#)
The Primer-BLAST tool uses Primer3 to design PCR primers to a sequence template. The potential products are then automatically analyzed with a BLAST search against user specified databases, to check the specificity to the target intended.

[ProSplign](#)
A utility for computing alignment of proteins to genomic nucleotide sequence. It is based on a variation of the Needleman Wunsch global alignment algorithm and specifically accounts for introns and splice signals. Due to this algorithm, ProSplign is accurate in determining splice sites and tolerant to sequencing errors.

[PubChem Power User Gateway \(PUG\)](#)
PUG provides access to PubChem services via a programmatic interface. PUG allows users to download data, initiate chemical structure searches, standardize chemical structures and interact with the E-utilities. PUG can be accessed using either standard URLs or via SOAP.

[PubChem Standardization Service](#)
Standardization, in PubChem terminology, is the processing of chemical structures in the same way used to create PubChem Compound records from contributors' original structures. This service lets users see how PubChem would handle any structure they would like to submit.

[PubChem Structure Search](#)
PubChem Structure Search allows the PubChem Compound Database to be queried by chemical structure or chemical structure pattern. The PubChem Sketcher allows a query to be drawn manually. Users may also specify the structural query input by PubChem Compound Identifier (CID), SMILES, SMARTS, InChI, Molecular Formula, or by upload of a supported structure file format.

Figure 2.4. L'outil Primer blast

Chapitre 2. Matériel et méthodes

Ensuite, on copie la séquence d'intérêt dans le primer blast avec la suppression des intervalles non souhaitées. On sélectionne le Forward et le Reverse primer (comme il est montré dans la figure) pour que le logiciel soit capable de connaître son intervalle de recherche (Fig 2.5).

NIH U.S. National Library of Medicine NCBI National Center for Biotechnology Information Sign in to NCBI

Primer-BLAST

A tool for finding specific primers

Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST).

Reset page Save search parameters Retrieve recent results Publication Tips for finding specific primers

PCR Template Enter accession, gi, or FASTA sequence (A RefSeq record is preferred) Clear

Range From 1 To 300 Forward primer 1 Reverse primer 668

Or, upload FASTA file Choisir un fichier Aucun fichier choisi

Primer Parameters

Use my own forward primer (5'→3' on plus strand) Clear

Use my own reverse primer (5'→3' on minus strand) Clear

PCR product size Min 70 Max 1000

of primers to return 10

Primer melting temperatures (Tm) Min 57.0 Opt 60.0 Max 63.0 Max Tm difference 3

Exon/intron selection A RefSeq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section

Exon junction span No preference

Exon junction match Min 5' match 7 Min 3' match 4 Max 3' match 8

Intron inclusion Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA

Activier Windows Accédez aux paramètres pour activer Windows.

Figure 2.5. Analyse de la séquence d'intérêt par Primer blast

On choisit l'option « Genomes for selected organism (primer reference assembly only) » dans le paramètre « Database » et on clique finalement sur « Get primer» pour obtenir les résultats (Fig 2.6).

Intron inclusion Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA

Intron length range Min 1000 Max 1000000

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Specificity check Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template

Search mode Automatic

Database Genomes for selected organisms (primary reference assembly only)

Exclusion Exclude predicted RefSeq transcripts (accession with XM, XR prefix) Exclude uncultured/environmental sample sequences

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

Allow splice variants Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires RefSeq mRNA sequence as PCR template input)

Get Primers Show results in a new window Use new graphic view

Advanced parameters Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

Figure 2.6. L'obtention des résultats à partir de primer blast.

2.5. Caractéristique d'une bonne amorce

Le choix de la bonne paire d'amorces se base sur les critères suivants :

- L'amorce spécifique doit contenir moins de 1000 base car la PCR n'amplifie pas une séquence supérieure à 1000 base.
- La teneur en GC doit être proche de 40%.
- Les températures d'hybridation des deux amorces (sens et anti-sens) doivent être le plus proches possibles l'une de l'autre, car lors d'une technique PCR la température d'hybridation est programmée en une seule valeur.
- Les produits aspécifiques de l'amorce sélectionnée doivent être toute supérieurs à 1000 bases.

2.6. Confirmation des résultats par *in silico*-PCR

Pour confirmer nos résultats, nous avons vérifié l'emplacement de notre paire d'amorces choisi par une PCR virtuelle en utilisant l'outil *In silico*-PCR (Fig 2.7).

UCSC In-Silico PCR

Genome: Assembly: Target: Forward Primer: Reverse Primer:

Max Product Size: Min Perfect Match: Min Good Match: Flip Reverse Primer:

About In-Silico PCR

In-Silico PCR searches a sequence database with a pair of PCR primers, using an indexing strategy for fast performance. See an example [video](#) on our YouTube channel.

Configuration Options

Genome and Assembly - The sequence database to search.
Target - If available, choose to query transcribed sequences.
Forward Primer - Must be at least 15 bases in length.
Reverse Primer - On the opposite strand from the forward primer. Minimum length of 15 bases.
Max Product Size - Maximum size of amplified region.
Min Perfect Match - Number of bases that match exactly on 3' end of primers. Minimum match size is 15.
Min Good Match - Number of bases on 3' end of primers where at least 2 out of 3 bases match.
Flip Reverse Primer - Invert the sequence order of the reverse primer and complement it.

Figure 2.7. L'outil *in silico*-PCR.

Chapitre 3. Résultats

3.1 Résultat du primer blast

Le site Ensembl nous a permis de montrer que le gène IL-13 est composé de 6 introns et 5 exons. Dans notre travail, nous avons choisi l'exon 1. L'outil Primer-Blast nous a donné dix différentes paires d'amorces (Fig 3.1). Le choix a été fait sur la paire 9, et cela en raison de son respect des conditions mentionnées dans le tableau (3.1).

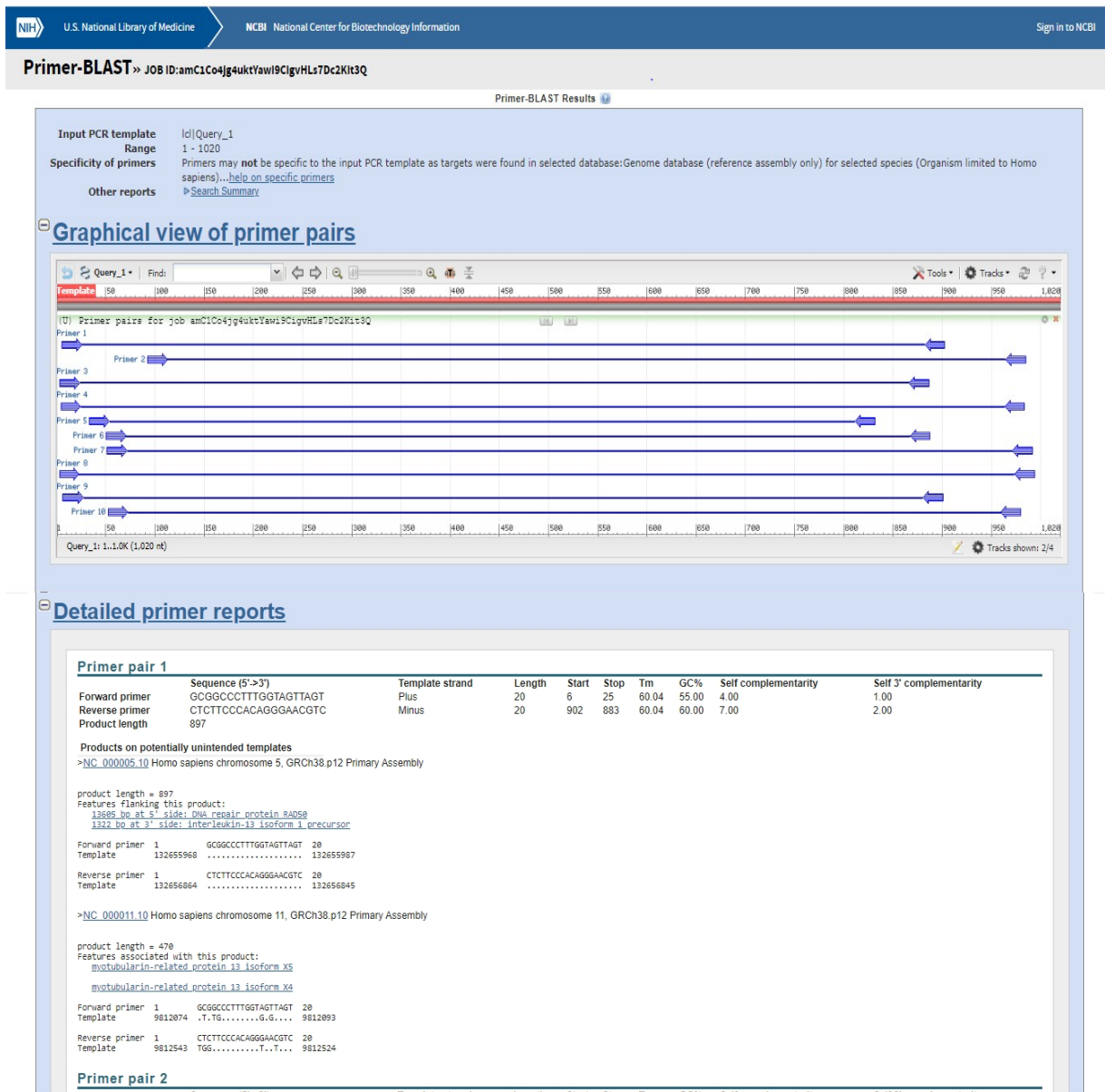


Figure 3.1. Résultat à partie de l'outil Primer-blast

Primer pair 9

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CGGCCCTTTGGTAGTTAGTGT	Plus	21	7	27	60.00	52.38	4.00	0.00
Reverse primer	CTTCCCACAGGGAACGTCAT	Minus	20	900	881	59.68	55.00	7.00	2.00
Product length	894								

Products on potentially unintended templates

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

product length = 894
 Features flanking this product:
[13686 bp at 5' side: DNA repair protein RAD50](#)
[1324 bp at 3' side: interleukin-13 isoform 1 precursor](#)

Forward primer 1 CGGCCCTTTGGTAGTTAGTGT 21
 Template 132655969 132655989

Reverse primer 1 CTTCCCACAGGGAACGTCAT 20
 Template 132656862 132656943

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

product length = 3510
 Features flanking this product:
[907493 bp at 5' side: heparan sulfate glucosaminase 3-O-sulfotransferase 1 isoform...](#)
[1057551 bp at 3' side: ras-related protein Rab-28 isoform 1](#)

Reverse primer 1 CTTCCCACAGGGAACGTCAT 20
 Template 12311006 AAC.....CT..... 12310987

Reverse primer 1 CTTCCCACAGGGAACGTCAT 20
 Template 12307497CC..T....A 12307516

Figure 3.2. Caractéristiques de la paire d'amorce choisie.

Tableau 3.1. La comparaison entre les critères d'une bonne amorce et notre amorce.

Les critères	Taux optimale	Notre amorce
Longueur	16 à 28 nucléotides	Amorce sens 21 nucléotides Amorces anti-sens 20 nucléotides
Température de fusion	50 C et 62 C	Amorces sens (60 C) Amorces anti-sens (59.68 C)
Teneur en CG	40 à 60%	Amorces sens (52.38%) Amorces anti-sens (55%)
Amorce spécifique	Inferieur à 1000 pb	894 pb
Produits aspécifiques	Supérieur à 1000 pb	Tous plus de 1000 pb

Pb : paire de base

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

Pour la confirmation des résultats, nous avons utilisé le programme «*in-silico*-PCR » (www.genome.ucsc.edu) qui nous a donné la localisation de notre produit dans le chromosome 5 ce qui a prouvé la validité et la spécificité de ces amorces.

[Home](#)
[Genomes](#)
[Genome Browser](#)
[Tools](#)
[Mirrors](#)
[Downloads](#)
[My Data](#)
[Projects](#)
[Help](#)
[About Us](#)

UCSC In-Silico PCR

Genome: Human
 Assembly: Dec. 2013 (GRCh38/hg38)
 Target: genome assembly
 Forward Primer: CGGCCCTTTGGTAGTAGTG
 Reverse Primer: CTTCCACAGGGAACGTCAT

Max Product Size: 4000
 Min Perfect Match: 15
 Min Good Match: 15
 Flip Reverse Primer:

About In-Silico PCR

In-Silico PCR searches a sequence database with a pair of PCR primers, using an indexing strategy for fast performance. See an example [video](#) on our YouTube channel.

Configuration Options

Genome and Assembly - The sequence database to search.
Target - If available, choose to query transcribed sequences.
Forward Primer - Must be at least 15 bases in length.
Reverse Primer - On the opposite strand from the forward primer. Minimum length of 15 bases.
Max Product Size - Maximum size of amplified region.
Min Perfect Match - Number of bases that match exactly on 3' end of primers. Minimum match size is 15.
Min Good Match - Number of bases on 3' end of primers where at least 2 out of 3 bases match.
Flip Reverse Primer - Invert the sequence order of the reverse primer and complement it.

Output

When successful, the search returns a sequence output file in fasta format containing all sequence in the database that lie between and include the primer pair. The fasta header describes the region in the database and the primers. The fasta body is capitalized in areas where the primer sequence matches the database sequence and in lower-case elsewhere. Here is an example from human.

```

>chr5:132655969-132656862 894bp CGGCCCTTTGGTAGTAGTG TTTCCACAGGGAACGTCAT
CGGCCCTTTGGTAGTAGTGAattaaaattaccgcacgggagtgat
ccccgtgacaatttagaacaagcaacagaccctctgtagcactct
gtgscgcctctccgacccgcccacgcttggctctggagacac
ctccagggcagggtcggctcggccggccggggtccctcggcc
tgaatgggggtgctggaagcgacagctgcccggccctcggccg
ctcccctccgctgctgacagcggctcggggagccctcggccg
gtgtcagccggccttgcctgctggcctcggaccgccccttgc
gcccctccagcctccagctccagactggcggctcgcgcgcca
ccccctcccgagccgcccacgcccggagcgggagggcccg
cgcgagatccccttatcggccctctccggtacataaggccaacc
ccctatctccggggccatgcccgcgcaaccgcccagcgccttct
cccacgcccggggcctccctcccacgctcccggagcctttggg
gccatgggggataagggcgttgaactaccgggcccggctcggggtt
gcacagaccagtagtctccgctctcccccacagggacacctgt
ggagatgctggggcctctactacagattaggaacagccgtagag
gggtcacagggcagtagggcactccagcactggggcctcggagg
gaaaggcagacttgggagtcagagcagcagctgggctgggagctt
cgaatgggacagaggggtgggaATGACGTTCCCTGTGGGAAG
    
```

Primer Melting Temperatures

Forward: 60.4 C cggcccttggtagtagtg
 Reverse: 62.3 C cttccacaggaacgctcat
 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](#).

Figure 3.3. Confirmation des résultats par *in silico*-PCR

Chapitre 4. Conclusions et perspectives

Chapitre 4. Conclusions et perspectives

L'allergie est devenue la première maladie chronique dans plusieurs régions du monde au cours des dernières décennies. Elles affectent jusqu'à 30% de la population de chaque pays.

L'IL-13 est une cytokine qui a reçu récemment beaucoup d'attention puisque les chercheurs ont découvert que cette cytokine est incluse dans presque toutes les maladies allergiques.

L'étude de son expression par les méthodes de biologie moléculaire, comme la technique PCR, au niveau du macrophage M2 consiste à utiliser des amorces pour amplifier la région encadrant ce gène dont cette étape là est l'étape clé pour la technique mentionnée si dessus.

Cette étude a permis aux chercheurs d'étudier l'implication de cette cytokine dans les maladies allergiques.

Ce travail a été pour objectif de concevoir de bonnes amorces pour le gène IL-13 afin de réaliser ultérieurement une PCR.

Chapitre 5. Références bibliographiques

1. Albert, J., et E. M. Fenyö. 1990. « Simple, Sensitive, and Specific Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Clinical Specimens by Polymerase Chain Reaction with Nested Primers ». *Journal of Clinical Microbiology* 28 (7): 1560-64.
2. BELAID Nadia. 2017. « Elaboration d'amorces pour le gène de la Glutathion peroxydase 3 GPx3 ». <http://dspace.univ-tlemcen.dz/bitstream/112/12000/1/Belaid-nadia.pdf>.
3. Bhattacharjee, Ashish, Meenakshi Shukla, Valentin P. Yakubenko, Anny Mulya, Suman Kundu, et Martha K. Cathcart. 2013. « IL-4 and IL-13 Employ Discrete Signaling Pathways for Target Gene Expression in Alternatively Activated Monocytes/Macrophages ». *Free Radical Biology and Medicine* 54 (janvier): 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.553>.
4. Bjermer, Leif, Marit Westman, Mats Holmström, et Magnus C. Wickman. 2019. « The Complex Pathophysiology of Allergic Rhinitis: Scientific Rationale for the Development of an Alternative Treatment Option ». *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology: Official Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology* 15: 24. <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0314-1>.
5. Bustin, Stephen A., Reinhold Mueller, et Tania Nolan. 2020. « Parameters for Successful PCR Primer Design ». In *Quantitative Real-Time PCR*, édité par Roberto Biassoni et Alessandro Raso, 2065:5-22. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9833-3_2.
6. Caraballo, Luis, Josefina Zakzuk, Bee Wah Lee, Nathalie Acevedo, Jian Yi Soh, Mario Sánchez-Borges, Elham Hossny, et al. 2016. « Particularities of Allergy in the Tropics ». *World Allergy Organization Journal* 9: 20. <https://doi.org/10.1186/s40413-016-0110-7>.
7. Chruszcz, Maksymilian, A. Brenda Kapingidza, Coleman Dolamore, et Krzysztof Kowal. 2018. « A Robust Method for the Estimation and Visualization of IgE Cross-Reactivity Likelihood between Allergens Belonging to the Same Protein Family ». Édité par Takuma Kato. *PLOS ONE* 13 (11): e0208276. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208276>.
8. Chuang, Li-Yeh, Yu-Huei Cheng, et Cheng-Hong Yang. 2013. « Specific Primer Design for the Polymerase Chain Reaction ». *Biotechnology Letters* 35 (10): 1541-49. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1249-8>.

Chapitre 5. Références bibliographiques

9. Davies, Luke C., Stephen J. Jenkins, Judith E. Allen, et Philip R. Taylor. 2013. « Tissue-Resident Macrophages ». *Nature Immunology* 14 (10): 986-95. <https://doi.org/10.1038/ni.2705>.
10. Eckl-Dorna, Julia, Sergio Villazala-Merino, Birgit Linhart, Alexander V. Karaulov, Yury Zhernov, Musa Khaitov, Verena Niederberger-Leppin, et Rudolf Valenta. 2019. « Allergen-Specific Antibodies Regulate Secondary Allergen-Specific Immune Responses ». *Frontiers in Immunology* 9 (janvier): 3131. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03131>.
11. Eisenmesser, Elan Zohar, David A Horita, Amanda S Altieri, et R.Andrew Byrd. 2001. « Solution Structure of Interleukin-13 and Insights into Receptor Engagement11Edited by P. E. Wright ». *Journal of Molecular Biology* 310 (1): 231-41. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4765>.
12. Epelman, Slava, Kory J. Lavine, et Gwendalyn J. Randolph. 2014. « Origin and Functions of Tissue Macrophages ». *Immunity* 41 (1): 21-35. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.013>.
13. Garibyan, Lilit, et Nidhi Avashia. 2013. « Polymerase Chain Reaction ». *The Journal of Investigative Dermatology* 133 (3): 1-4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>.
14. Ginhoux, Florent, et Steffen Jung. 2014. « Monocytes and Macrophages: Developmental Pathways and Tissue Homeostasis ». *Nature Reviews Immunology* 14 (6): 392-404. <https://doi.org/10.1038/nri3671>.
15. Gordon, Siamon, et Fernando O. Martinez. 2010. « Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions ». *Immunity* 32 (5): 593-604. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.007>.
16. Gour, Naina, et Marsha Wills-Karp. 2015. « IL-4 and IL-13 Signaling in Allergic Airway Disease ». *Cytokine* 75 (1): 68-78. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.05.014>.
17. Grünig, Gabriele, David B. Corry, Joan Reibman, et Marsha Wills-Karp. 2012. « Interleukin 13 and the Evolution of Asthma Therapy ». *American Journal of Clinical and Experimental Immunology* 1 (1): 20-27.
18. Hashimoto, Daigo, Andrew Chow, Clara Noizat, Pearline Teo, Mary Beth Beasley, Marylene Leboeuf, Christian D. Becker, et al. 2013. « Tissue-Resident Macrophages Self-Maintain Locally throughout Adult Life with Minimal Contribution from Circulating Monocytes ». *Immunity* 38 (4): 792-804. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.004>.
19. Jappe, Uta, Christian Schwager, Andra B. Schromm, Nestor González Roldán, Karina Stein, Holger Heine, et Katarzyna A. Duda. 2019. « Lipophilic

- Allergens, Different Modes of Allergen-Lipid Interaction and Their Impact on Asthma and Allergy ». *Frontiers in Immunology* 10 (février): 122. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00122>.
20. Jensen-Jarolim, E., H. J. Bax, R. Bianchini, S. Crescioli, T. R. Daniels-Wells, D. Dombrowicz, E. Fiebiger, et al. 2018. « AllergoOncology: Opposite Outcomes of Immune Tolerance in Allergy and Cancer ». *Allergy* 73 (2): 328-40. <https://doi.org/10.1111/all.13311>.
21. Kadri, Karim. 2020. « Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications ». In *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*, édité par Madan L. Nagpal, Oana-Maria Boldura, Cornel Baltă, et Shymaa Enany. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86491>.
22. Kanji, Salmaan, et Clarence Chant. 2010. « Allergic and Hypersensitivity Reactions in the Intensive Care Unit ». *Critical Care Medicine* 38 (6 Suppl): S162-168. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181de0c99>.
23. Kay, A. B., éd. 2008. *Allergy and allergic diseases*. 2nd ed. Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.
24. Labonte, Adam C., Annie-Carole Tosello-Trampont, et Young S. Hahn. 2014. « The Role of Macrophage Polarization in Infectious and Inflammatory Diseases ». *Molecules and Cells* 37 (4): 275-85. <https://doi.org/10.14348/molcells.2014.2374>.
25. Lesiak, Aleksandra, Piotr Kuna, Marcin Zakrzewski, Michael van Geel, Reno S. Bladergroen, Karolina Przybylowska, Iwona Stelmach, et al. 2011. « Combined Occurrence of Filaggrin Mutations and IL-10 or IL-13 Polymorphisms Predisposes to Atopic Dermatitis: Filaggrin Mutations and IL-10 or IL-13 Polymorphisms ». *Experimental Dermatology* 20 (6): 491-95. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2010.01243.x>.
26. Marone, Giancarlo, Francescopaolo Granata, Valentina Pucino, Antonio Pecoraro, Enrico Heffler, Stefania Loffredo, Guy W. Scadding, et Gilda Varricchi. 2019. « The Intriguing Role of Interleukin 13 in the Pathophysiology of Asthma ». *Frontiers in Pharmacology* 10 (décembre): 1387. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01387>.
27. Matricardi, P. M., J. Kleine-Tebbe, H. J. Hoffmann, R. Valenta, C. Hilger, S. Hofmaier, R. C. Aalberse, et al. 2016. « EAACI Molecular Allergology User's Guide ». *Pediatric Allergy and Immunology* 27 (mai): 1-250. <https://doi.org/10.1111/pai.12563>.

Chapitre 5. Références bibliographiques

28. McKee, Amy S, et Andrew P Fontenot. 2016. « Interplay of Innate and Adaptive Immunity in Metal-Induced Hypersensitivity ». *Current Opinion in Immunology* 42 (octobre): 25-30. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.05.001>.
29. Minty, A., S. Asselin, A. Bensussan, D. Shire, N. Vita, A. Vyakarnam, J. Wijdenes, P. Ferrara, et D. Caput. 1997. « The Related Cytokines Interleukin-13 and Interleukin-4 Are Distinguished by Differential Production and Differential Effects on T Lymphocytes ». *European Cytokine Network* 8 (2): 203-13.
30. Moreira, Ana Paula, et Cory M. Hogaboam. 2011. « Macrophages in Allergic Asthma: Fine-Tuning Their Pro- and Anti-Inflammatory Actions for Disease Resolution ». *Journal of Interferon & Cytokine Research* 31 (6): 485-91. <https://doi.org/10.1089/jir.2011.0027>.
31. Mori, Simone, Pamela Maher, et Bruno Conti. 2016. « Neuroimmunology of the Interleukins 13 and 4 ». *Brain Sciences* 6 (2): 18. <https://doi.org/10.3390/brainsci6020018>.
32. Moy, F. J., E. Diblasio, J. Wilhelm, et R. Powers. 2001. « Solution Structure of Human IL-13 and Implication for Receptor Binding ». *Journal of Molecular Biology* 310 (1): 219-30. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4764>.
33. Moy, Franklin J, Elizabeth Diblasio, James Wilhelm, et Robert Powers. 2001. « Solution Structure of Human IL-13 and Implication for Receptor Binding » Edited by P. E. Wright ». *Journal of Molecular Biology* 310 (1): 219-30. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4764>.
34. Mullis, K. B. 1990. « The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction ». *Scientific American* 262 (4): 56-61, 64-65. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0490-56>.
35. Munitz, A., E. B. Brandt, M. Mingler, F. D. Finkelman, et M. E. Rothenberg. 2008. « Distinct Roles for IL-13 and IL-4 via IL-13 Receptor 1 and the Type II IL-4 Receptor in Asthma Pathogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (20): 7240-45. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802465105>.
36. Murray, Peter J., et Thomas A. Wynn. 2011. « Protective and Pathogenic Functions of Macrophage Subsets ». *Nature Reviews. Immunology* 11 (11): 723-37. <https://doi.org/10.1038/nri3073>.
37. Murray, Peter J., Judith E. Allen, Subhra K. Biswas, Edward A. Fisher, Derek W. Gilroy, Sergij Goerdts, Siamon Gordon, et al. 2014. « Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines ». *Immunity* 41 (1): 14-20. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008>.

Chapitre 5. Références bibliographiques

38. Nagarkar, Deepti R., Emily R. Bowman, Dina Schneider, Qiong Wang, Jee Shim, Ying Zhao, Marisa J. Linn, et al. 2010. « Rhinovirus Infection of Allergen-Sensitized and -Challenged Mice Induces Eotaxin Release from Functionally Polarized Macrophages ». *The Journal of Immunology* 185 (4): 2525-35. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000286>.
39. Nazimek, Katarzyna, Włodzimierz Ptak, Janusz Marcinkiewicz, et Krzysztof Bryniarski. 2013. « Macrophage Function in Allergic and Autoimmune Responses ». *Journal of Physical Therapy and Health Promotion* 1 (1): 36-45. <https://doi.org/10.18005/PTHP0101005>.
40. Ort, Melanie J., Sven Geissler, Anastasia Rakow, et Janosch Schoon. 2019. « The Allergic Bone Marrow? The Immuno-Capacity of the Human Bone Marrow in Context of Metal-Associated Hypersensitivity Reactions ». *Frontiers in Immunology* 10: 2232. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02232>.
41. Pomés, Anna, Janet M. Davies, Gabriele Gadermaier, Christiane Hilger, Thomas Holzhauser, Jonas Lidholm, Andreas L. Lopata, et al. 2018. « WHO/IUIS Allergen Nomenclature: Providing a Common Language ». *Molecular Immunology* 100 (août): 3-13. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.03.003>.
42. Powell, Cassandra, Lisa Thompson, et Robert J. Murtaugh. 2013. « Type III Hypersensitivity Reaction with Immune Complex Deposition in 2 Critically Ill Dogs Administered Human Serum Albumin: Hypersensitivity Reaction to Human Serum Albumin in Dogs ». *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 23 (6): 598-604. <https://doi.org/10.1111/vec.12085>.
43. Price, April E., Hong-Erh Liang, Brandon M. Sullivan, R. Lee Reinhardt, Chris J. Easley, David J. Erle, et Richard M. Locksley. 2010. « Systemically Dispersed Innate IL-13-Expressing Cells in Type 2 Immunity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (25): 11489-94. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003988107>.
44. Rael, Efren L., et Richard F. Lockey. 2011. « Interleukin-13 Signaling and Its Role in Asthma ». *The World Allergy Organization Journal* 4 (3): 54-64. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e31821188e0>.
45. Seyfizadeh, Narges, Nayer Seyfizadeh, Tohid Gharibi, et Zohreh Babaloo. 2015. « Interleukin-13 as an Important Cytokine: A Review on Its Roles in Some Human Diseases ». *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 62 (4): 341-78. <https://doi.org/10.1556/030.62.2015.4.2>.

Chapitre 5. Références bibliographiques

46. Shapouri-Moghaddam, Abbas, Saeed Mohammadian, Hossein Vazini, Mahdi Taghadosi, Seyed-Alireza Esmaili, Fatemeh Mardani, Bitu Seifi, Asadollah Mohammadi, Jalil T. Afshari, et Amirhossein Sahebkar. 2018. « Macrophage Plasticity, Polarization, and Function in Health and Disease ». *Journal of Cellular Physiology* 233 (9): 6425-40. <https://doi.org/10.1002/jcp.26429>.
47. Sheikh, Faruk, Harold Dickensheets, Joao Pedras-Vasconcelos, Thirumalai Ramalingam, Laura Helming, Siamon Gordon, et Raymond P. Donnelly. 2015. « The Interleukin-13 Receptor-A1 Chain Is Essential for Induction of the Alternative Macrophage Activation Pathway by IL-13 but Not IL-4 ». *Journal of Innate Immunity* 7 (5): 494-505. <https://doi.org/10.1159/000376579>.
48. Shibani Basu. s. d. « Hypersensitivity: An Overview ». <file:///C:/Users/N'Tic-InFormatique/Downloads/hypersensitivity-an-overview.pdf>.
49. Sica, Antonio, Marco Erreni, Paola Allavena, et Chiara Porta. 2015. « Macrophage Polarization in Pathology ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 72 (21): 4111-26. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1995-y>.
50. Sim, Lee Yen, Nur Zahirah Abd Rani, et Khairana Husain. 2019. « Lamiaceae: An Insight on Their Anti-Allergic Potential and Its Mechanisms of Action ». *Frontiers in Pharmacology* 10: 677. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00677>.
51. Tanno, Luciana Kase, Moises A. Calderon, Helen E. Smith, Mario Sanchez-Borges, Aziz Sheikh, Pascal Demoly, et Joint Allergy Academies. 2016. « Dissemination of Definitions and Concepts of Allergic and Hypersensitivity Conditions ». *The World Allergy Organization Journal* 9: 24. <https://doi.org/10.1186/s40413-016-0115-2>.
52. Tu, Ming, Wei Wange, Lin Cai, Penglei Zhu, Zhichao Gao, et Weiming Zheng. 2016. « IL-13 Receptor A2 Stimulates Human Glioma Cell Growth and Metastasis through the Src/PI3K/Akt/MTOR Signaling Pathway ». *Tumor Biology* 37 (11): 14701-9. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5346-x>.
53. VanGuilder, Heather D., Kent E. Vrana, et Willard M. Freeman. 2008. « Twenty-Five Years of Quantitative PCR for Gene Expression Analysis ». *BioTechniques* 44 (5): 619-26. <https://doi.org/10.2144/000112776>.
54. Viel, Sébastien, Rémi Pescarmona, Alexandre Belot, Audrey Nosbaum, Christine Lombard, Thierry Walzer, et Frédéric Bérard. 2018. « A Case of Type 2 Hypersensitivity to Rasburicase Diagnosed with a Natural Killer Cell Activation Assay ». *Frontiers in Immunology* 9: 110. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00110>.

Chapitre 5. Références bibliographiques

55. Vries, J. E. de. 1998. « The Role of IL-13 and Its Receptor in Allergy and Inflammatory Responses ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 102 (2): 165-69. [https://doi.org/10.1016/s0091-6749\(98\)70080-6](https://doi.org/10.1016/s0091-6749(98)70080-6).
56. Walford, Hannah H., et Taylor A. Doherty. 2013. « STAT6 and Lung Inflammation ». *JAK-STAT* 2 (4): e25301. <https://doi.org/10.4161/jkst.25301>.
57. Wang, Rong, Yu-Lan Lu, Hua-Tuo Huang, Hai-Mei Qin, Yan Lan, Jun-Li Wang, Chun-Fang Wang, et Ye-Sheng Wei. 2018. « Association of Interleukin 13 Gene Polymorphisms and Plasma IL 13 Level with Risk of Systemic Lupus Erythematosus ». *Cytokine* 104 (avril): 92-97. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.09.034>.
58. Watts, Annabelle M., Allan W. Cripps, Nicholas P. West, et Amanda J. Cox. 2019. « Modulation of Allergic Inflammation in the Nasal Mucosa of Allergic Rhinitis Sufferers With Topical Pharmaceutical Agents ». *Frontiers in Pharmacology* 10: 294. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00294>.
59. Wu, Jain-Shing, Chungnan Lee, Chien-Chang Wu, et Yow-Ling Shiue. 2004. « Primer Design Using Genetic Algorithm ». *Bioinformatics (Oxford, England)* 20 (11): 1710-17. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth147>.
60. Wynn, Thomas A. 2003a. « IL-13 Effector Functions ». *Annual Review of Immunology* 21: 425-56. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141142>.
61. ———. 2003b. « IL-13 EFFECTOR FUNCTIONS ». *Annual Review of Immunology* 21 (1): 425-56. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141142>.
62. Wynn, Thomas A., Ajay Chawla, et Jeffrey W. Pollard. 2013. « Macrophage Biology in Development, Homeostasis and Disease ». *Nature* 496 (7446): 445-55. <https://doi.org/10.1038/nature12034>.
63. Yuan, Shi-Min. 2019. « Interleukin-13 in the pathogenesis of pulmonary artery hypertension ». *Journal of Laboratory Medicine* 43 (1): 5-11. <https://doi.org/10.1515/labmed-2018-0323>.
64. Zhang, Jihui, Jie Chen, et Clive Robinson. 2018. « Cellular and Molecular Events in the Airway Epithelium Defining the Interaction Between House Dust Mite Group 1 Allergens and Innate Defences ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (11): 3549. <https://doi.org/10.3390/ijms19113549>.
65. Zhong, Yong, Lihong Huang, Zhisen Zhang, Yunjing Xiong, Liping Sun, et Jian Weng. 2016. « Enhancing the Specificity of Polymerase Chain Reaction by Graphene Oxide through Surface Modification: Zwitterionic Polymer Is Superior to Other Polymers with Different Charges ». *International Journal of*

Chapitre 5. Références bibliographiques

Nanomedicine Volume 11 (novembre): 5989-6002.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S120659>.

Résumé

Introduction : Lorsqu'il est exposé à des substances allergiques, le système immunitaire stimule les réactions d'hypersensibilité, dont l'allergie est l'une de ces réactions qui implique des macrophages de type M2. L'expression de l'interleukine-13 au cours de cette réponse immunitaire et son effet sur les maladies allergiques fait l'objet de plusieurs études dont l'étude de son expression par la PCR soit une étape fondamentale pour le dépistage de l'allergie.

Objectif : L'objectif de notre travail est de concevoir des amorces du gène IL-13 pour connaître son effet dans l'allergie.

Matériel et méthodes : Les amorces spécifiques pour le gène IL-13 ont été conçus à l'aide de l'outil Primer-Blast à travers le site « www.ncbi.nih.gov ».

Résultats : Le choix s'est porté sur la neuvième paire des amorces en raison de ses produits aspécifiques qui sont supérieures à 1000 paires de bases et aussi parce qu'elle répond à toutes les conditions requises.

Conclusion : La paire d'amorce sélectionnée sera utilisée pour amplifier le gène IL-13 par la PCR afin que les chercheurs puissent étudier son implication dans l'allergie.

Mots clés : Allergie, Macrophage M2, Interleukine-13, PCR, Conceptions des amorces.

Abstract

Introduction: When exposed to allergic substances, the immune system stimulates hypersensitivity reactions, of which allergy is one of those reactions that involves type M2 macrophages. The expression of interleukin-13 during this immune response and its effect on allergic diseases is the subject of several studies, including the study of its expression by PCR is a fundamental step in the screening of allergy.

Objective: The objective of our work is to design primers for the IL-13 gene to know its effect in allergy.

Material and methods: The primers specific for the IL-13 gene were designed using the Primer-Blast tool through the site "www.ncbi.nih.gov".

Results: The choice fell on the ninth pair of primers because of its non-specific products which are larger than 1000 base pairs and also because it meets all the required conditions.

Conclusion: The selected primer pair will be used to amplify the IL-13 gene by PCR so that researchers can study its involvement in allergy.

Keywords: Allergy, Macrophage M2, Interleukin-13, PCR, Primer designs.

ملخص

مقدمة: عند التعرض لمسببات الحساسية، يطلق الجهاز المناعي تفاعلات فرط الحساسية، و احد هذه التفاعلات يشمل الخلايا البالعة من النوع M2. إن التعبير عن الأنترلوكين-13 أثناء هذه الاستجابة المناعية وتأثيره على أمراض الحساسية هو موضوع للعديد من الدراسات التي أجريت أو يمكن أن تجرى، بما في ذلك دراسة تعبيره عن طريق تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) وهو خطوة أساسية في فحص الحساسية.

هدف: الهدف من عملنا هو تصميم بادئات للجين IL-13 لمعرفة تأثيره في أمراض الحساسية.

مواد و طرق: تم تصميم المواد الأولية الخاصة بجين IL-13 باستخدام أداة Primer-Blast من خلال الموقع "www.ncbi.nih.gov".

نتائج: وقع الاختيار على الزوج التاسع من البادئات نظرًا لمنتجاته غير المحددة التي تزيد عن 1000 زوج من القواعد وأيضًا لأنها تلبى جميع الشروط المطلوبة.

خلاصة: سيتم استخدام زوج البادئات المحدد لتضخيم جين IL-13 بواسطة PCR حتى يتمكن الباحثون من دراسة مشاركته في الحساسية.

كلمات مفتاحية: حساسية، البالعات (ماكروفاغ M2)، أنترلوكين 13، PCR، تصميم البادئات.