

**UNIVERSITÉ DE TLEMCEM – ABOU-BEKRBELKAÏD**  
**FACULTÉ SNV-STU – DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE**

**LABORATOIRE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE APPLIQUEE ET IMMUNOLOGIE – BIOMOLIM W0414100**

**MEMOIRE**

Présenté par

**SENOUSSAOUI Lamiae Halima**

*En vue de l'obtention du*

**Diplôme de Master**

Spécialité Immunologie

**Thème**

**FoxP3 Treg et Breg**

**Sous la direction du Professeur  
Mourad ARIBI**

**Soutenu le 20/09/2020**

**Devant le jury :**

Président	Dr Chems Eddine SMAHI	Professeur	<b>Université de Tlemcen</b>
Directeur de thèse	Dr Mourad ARIBI	Professeur	<b>Université de Tlemcen</b>
Examinatrice	Dr Nabila BRAHAMI	MCA	<b>Université de Tlemcen</b>

**Septembre 2020**

**Introduction**

FoxP3 est un facteur de transcription spécifique de la lignée des cellules T régulatrices, ces derniers jouent un rôle centrale dans la régulation des réponses immunitaires aux auto-antigènes, aux agents infectieux et aux tumeurs. Le développement et l'efficacité de l'activité des Tregs semblent dépendants des Bregs pour une meilleure régulation des réponses auto-immunes et anti-cancéreuses.

L'expression et la fonction de FoxP3 ont fourni de nouvelles informations critiques sur la biologie des cellules Treg et sur le mécanisme cellulaires de l'homéostasie immunitaire.

Ce travail consiste à la conception d'amorces spécifiques du gèneFoxP3 qui serviront pour une réplication efficace et optimale par la PCR.

**Objectifs**

L'objectif de notre travail est de concevoir des amorces qui encadrent le FOX-P3 de cellule T régulatrice et B régulatrice dans les réponses immunitaires.

**Matériels et méthodes**

Recherche de la séquence de référence du gène FoxP3 dans la base de données ensembl et utilisation du logiciel Primer blast.

**Résultat**

Une paire d'amorces spécifiques a été choisi donnant un seul produit spécifique d'amplification de 413 pb

**Mots clés** :gèneFoxP3, LTreg, LBreg, tumeur, amorce, PCR

**Background**

FoxP3 is a line specific transcription factor for regulatory T cells, which play a central role in the regulation of immune responses to autoantigens, infectious agents and tumors. The development and efficacy of Tregs activity appears to be dependent on Bregs for better regulation of autoimmune and anti-cancer responses.

FoxP3 expression and function have provided critical new information on Treg cell biology and the cellular mechanism of immune homeostasis.

This work involves the design of primers specific for the FoxP3 gene which will be used for efficient and optimal replication by PCR.

**Objective**

The goal of our work is to design primers that frame regulatory T cell FOX-P3 and regulatory B cells in immune responses.

**Material and methods**

Search for the reference sequence of the FoxP3 gene in the ensemble database and use of the Primer blast software.

**Results**

A pair of specific primers was chosen giving a single specific product of 413 pb amplification.

**Key words:** FoxP3 gene, LTreg, LBreg, tumor, primer, PCR

---

---

---

**مقدمة :**

العوامل المعدية والأورام. يبدو أن تطوير وكفاءة نشاط Treg يعتمد على Bregs لتنظيم أفضل للمناعة الذاتية والاستجابات المضادة للسرطان. قدم تعبير FoxP3 ووظيفته معلومات جديدة مهمة عن بيولوجيا الخلايا Treg وعلى الآلية الخلوية للتوازن المناعي. يتضمن هذا العمل تصميم البادئات الخاصة بجين FoxP3 والتي سيتم استخدامها للنسخ الفعال والأمثل بواسطة PCR.

**الهدف :**

الهدف من عملنا هو تصميم مواد أولية توطر الخلية التائية التنظيمية FOX-P3 والخلايا البائية التنظيمية في الاستجابات المناعية.

**الوسائل والطرق:**

ابحث عن التسلسل المرجعي لجين FoxP3 في قاعدة بيانات المجموعة واستخدم برنامج Primer blast.

**النتائج:**

تم اختيار زوج من البادئات المحددة لإعطاء منتج واحد محدد تضخيم 413 نقطة أساس

**الكلمات المفتاحية:** جين FoxP3، LTreg، LBreg، ورم، برايمر، PCR

## DEDICACES

*Je dédie cet humble travail avec sincérité, fierté et joie : "A DIEU le tout puissant " Qui nous a urage de mener à bout ce mémoire Tu as exaucé l'une de mes plus grandes supplications, gloire te soit rendue.*

*A mes chers parents " qui ont œuvré pour ma réussite de part leur amour, leur confiance, tous les sacrifices consentis et leur précieux conseils, pour toute leur assistance et présence dans ma vie.*

*A mes adorables sœurs "Khawla, Khadidja, Téma. Les mots ne suffisent pour exprimer l'attachement et l'affection que je porte pour vous. "*

*A mes chers frères Mohammed et Fethi" Pour leur présence, leurs encouragements et Surtout pour leur grande compréhension "*

*A mabelle-soeur "Narimane et à mes chers nièces "Nardjes, Ines Meriem, Soundous, Farouk, Iyed, Mohamed Yacine. Parce que sans vous la vie n'a plus tout son charme. "*

*Et à mes chères amies et sœurs SERIR hanane, SEKOURI Sarah et DERGAL Malika avec qui j'ai partagé des moments de joie, de rire et de bonheur, merci d'avoir été là à tout moment, Merci !!!*

*Je vous aime.*

*Senoussaoui. Lamia*

**Avant-propos**

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

A l'issue de ce travail, je tiens à adresser mes plus sincères remerciements au Pr. Mourad ARIBI, mon Directeur de Mémoire. Je vous remercie pour votre aide, votre disponibilité et vos précieux conseils. J'avais de la chance d'avoir effectué mes Travaux dans votre Laboratoire.

Je voudrais également remercier les membres du jury A nos examinateurs d'Université de Tlemcen, Mme NOUARI Wafa et Mme BRAHAMI pour avoir pris de votre temps afin de participer à ce jury.

Merci beaucoup à toute l'équipe I du Laboratoire du Pr. Mourad ARIBI.

## TABLE DES MATIÈRES

Résumé	lii
Abstract	lv
Résumé en Arabe	v
Avant-propos	vi
Table des matières	vii
Liste des figures	x
Liste des tableaux	xi
Liste des abréviations	xii
Introduction	1

### Chapitre 1. Revue de la littérature

K :::::::::::

I. FOX-P3	03
1. Généralité	03
1.1. Définition	03
1.2. Structure	03
1.3. Signalisation, fonctions et régulations de FOX-P3	04
II. Lymphocytes T régulateurs	06
1. Généralité	06
1.1. Définition	06
1.2. Diversité phénotypique des cellules T régulatrices	06
1.3. Mécanismes d'action des cellules T régulatrices	07
1.4. Lymphocytes Treg dans le cancer	08
1.5. Mécanismes de suppression des cellules T reg	08
1.5.1. Altération des cellules dendritiques via CTLA-4	09

1.5.2. Implication des cytokines	09
1.5.3. Implication des check points	09
1.5.4. Implication des métabolites immunosuppresseurs	10
1.6. Inhibition des cellules T regularices	11
III. Cellules B regulatrices	12
1. Définition	12
2. L'ontogénese les lymphocytes B	12
3. Phénotypes et sous-ensembles des B regs	13
4. Les mécanismes d'action des LB régulateurs	15
4.1 Controles de la réponse immunitaire adaptative	15
4.2 Contrôle de la réponse immunitaire innée	15
5. Mécanisme suppressifs des cellules B regs	16
a. Suppression dépendante de l'IL-10	16
b. Suppression indépendante de l'IL-10	18
6. LBregs et réponse anti tumorales	19
IV. PCR	19
1. Définition	19
2. Principe	19
3. Acteurs de la PCR	20
4. Etrapes de la PCR	20
<b>Problématique et objectifs</b>	
1. Problématique	21
2. L'Objectif	21
3. But	21

**Chapitre 2 : Matériels et méthodes**

2. Matériels et méthodes	22
2.1. Conception d'amorce	22
2.2. Sélection d'amorce	22
2.2.1. teneur en GC	22
2.2.2. spécialité	22
2.2.3. longueur de l'amorce	22
2.2.4. complémentarité	22
2.2.5. Température de fusion	23
2.2.6. Séquence à l'extrémité 3'	23
2.3. Séquence du gene FOXP3	23
2.4. Design de Primer	24
2.5. Caractéristiques d'une bonne amorce	26
3. Résultat	27
3.1. Résultat de primer BLAST	27
3.2. Interprétation des résumtats	27
3.3. Confirmation des résultats	28

---

**LISTE DES FIGURES**

<b>Figure 1</b> Structure de FOXP3	4
<b>Figure 2</b> Cascade de signalisation de FOXP3	5
<b>Figure 3</b> Diversité phénotypique des cellules T reg	7
<b>Figure 4</b> Mécanisme d'action des cellules Treg	8
<b>Figure 5</b> L'ontogénèse des cellules B	13
<b>Figure 6</b> Mécanisme de contrôle de la réponse immunitaire par les LB reg	16
<b>Figure 7</b> Suppression dépendante de l'IL10	17
<b>Figure 8</b> Suppression indépendante de l'IL10	18
<b>Figure 2.1.</b> Base de données « Ensembl »	24
<b>Figure 2.2.</b> La séquence encadrée du gène Foxp3 (exon 6)	24
<b>Figure 2.3.</b> Le site de NCBI	25
<b>Figure 2.4.</b> L'outil Primer BLAST	25
<b>Figure 2.5.</b> Analyse de la séquence d'intérêt par le Primer BLAST	26
<b>Figure 3.1.</b> Résultat de Primer BLAST	27
<b>Figure 3.2.</b> Confirmation des résultats par le logiciel PCR In Silico	29

**LISTE DES TABLEAUX**

<b>TABLEAU 1</b> Effets négatifs et positifs des principales cellules immunosuppressives	10
<b>TABLEAU 2</b> Les sous ensembles des phénotypes des cellules B reg	14

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

### A

ADN: acide désoxyribonucléique

AMP : **adenosine 3', 5' monophosphate**

APC : cellule présentatrices d'antigène

### B

BCR : recepteur des cellules B

### C

CMH : **complexemajeurd'histocompatibilité**

CTL-4: cytotoxic T-lymphocyt-associated protein 4

### F

FOXP3 : Forkhead box p3

FAS : *factor activatingexoenzymes*

### G

GZB : Granzyme B

### H

HSC : cellule souche hématopoïétique (*hematopoiese stem cell*)

I

IFN : interféron

Ig: immunoglobuline

IL : interleukine

IDO: Indoléaminedioxygénase

ICAM:intercellularadhesionmolecule (molécule d'adhésion intercellulaire)

**L**

LT reg : lymphocytes T régulateurs

LTh : lymphocyte T helper

LB reg : lymphocytes B régulateurs

LTC : lymphocyte T cytotoxique

LFA-1 :Lymphocyte Function Associated antigen-1

LAG-3 : Gène d'activation lymphocytaire 3

**N**

NF- $\kappa$ B: facteur nucléaire kappa B (*nuclear factor-kappa B*)

NFAT:facteur nucléaire des cellules T actives

NK:*natural killer*

**O**

OLS: organe lymphoïde secondaire

**P**

PDAA: peptide dérivés d'autoantigène

PCR: *polymerase chain reaction*

PP1: protéine phosphatase.1

PD.1: Programmed cell death 1

**T**

TGF- $\beta$ : **facteur de croissance transformant $\beta$**  (*transforming growth factor- $\beta$* )

Th1: lymphocyte T helper de type 1

Th2: lymphocyte T helper de type 2

Th3: lymphocyte T helper de type 3

Th17: lymphocyte T helper de type 17

TLR: récepteurs de type Toll (*Toll-Like Receptor*)

TNF: facteur de nécrose tumorale (*tumor necrosis factor*)

Tr1: lymphocyte T reg de type 1

TDO: tryptophane dioxygénase

TME : microenvironnement tumorale

Taq P : taq polymérase

Tf : température de fusion

**V**

VIH : Virus de l'Immunodéficience humaine

### INTRODUCTION

Le système immunitaire a évolué des mécanismes sophistiqués pour effectuer des réponses immunitaires protectrices efficaces et pour limiter l'auto-immunité, l'inflammation excessive et la réponse immunitaire infectieuse aux allergènes conventionnels via l'activité immunosuppressive des cellules T et B régulatrices.

Les lymphocytes T régulateurs (LTreg) et B régulateurs (LBreg) représentent des populations hautement différenciées en termes de phénotypes et d'origine. Le développement et l'efficacité de l'activité des Tregs semblent dépendants des Bregs pour une meilleure régulation des réponses auto-immunes et anti-cancéreuses.

Les Tregs sont activés dans le contrôle des réponses immunitaires, leurs premières cibles identifiées sont les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> effecteurs dont l'inhibition de leur fonction marque son rôle dans la diminution de la réponse humorale des lymphocyte B ainsi que les Tregs ont aussi la capacité de freiner les réponses cytotoxiques en contrôlant la prolifération des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et leur production d'IFN $\gamma$ , tout comme celle des cellules *Natural killer* (NK) et NKT (Piccirillo and Shevach, 2001).

Les LBregs contrôlent également le développement des réponses immunitaires, car ils peuvent (Gottschalk et al., 2012) inhiber la maturation et la fonction des cellules dendritiques, (Polansky et al., 2008) inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, et ils ont aussi la capacité d'induire la production et l'activation des Tregs (Piccirillo and Shevach, 2001).

Selon le mode d'expression du facteur de transcription Foxp3<sup>+</sup>, les Tregs peuvent se distinguer en deux grandes sous-populations, LTregs naturels (nTreg) et les LT regs induits (iTreg) provoqués par l'intermédiaire de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 ou le TGF $\beta$ . Il est important de noter que les cytokines jouent un rôle dans l'action suppressive de certains Tregs, en particulier les Tr1 et les TH3 issus de la différenciation des iTregs. Les Tr1 sont de puissants producteurs de la cytokine IL-10 qui a un effet autocrine inhibant leur propre prolifération et peuvent réguler les réponses des lymphocytes B, les TH3 produisent de grande quantité de TGF $\beta$  en réponse à une stimulation spécifique d'antigènes administrés par voie orale (Pereira et al., 2017).

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR, *polymerase chaine reaction*), représente une méthode de biologie moléculaire très utilisée, vu sa rapidité, sa sensibilité et sa spécificité. Elle consiste à utiliser, de manière répétitive, le pouvoir de l'ADN polymérase, celui de synthétiser un brin complémentaire d'ADN à partir d'une petite séquence d'ADN spécifique qu'on appelle amorce (primer en anglais).

Une amorce est une séquence complémentaire à une région située au début de l'ADN que l'on veut amplifier. Elle doit être choisie avec beaucoup d'attention pour que l'efficacité de la PCR soit optimale (Mathys et al., 2007).

Pour notre part, notre objectif consistait à la conception, avec spécificité des amorces encadrant le gène FoxP3.



# CHAPITRE 1

Revue de la littérature

# CHAPITRE 1

## Revue de la littérature

### I. FOX-P3

#### 1. Généralités

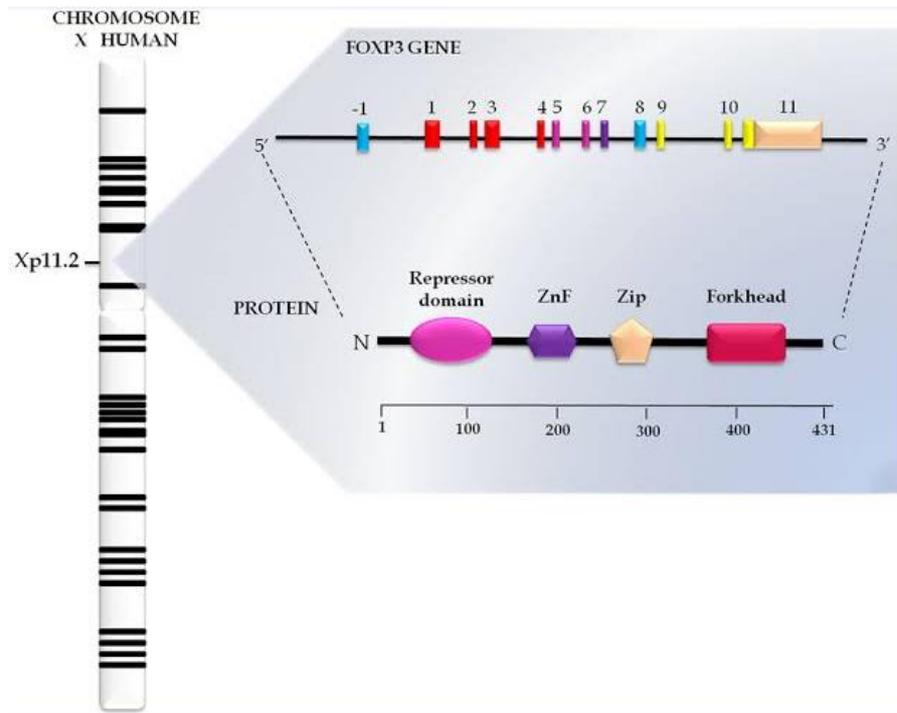
##### 1.1. Définition

FoxP3 ( Forkhead box P3) est un facteur de transcription clé et spécifique à la lignée qui est requis pour le développement et la fonction des lymphocytes T régulateurs dans différents micro-environnements, il est un membre de la famille des gènes régulateurs transcriptionnels caractérisés par leur domaine de liaison à l'ADN « forkhead » « tête de fourche » avec qui il partage les caractéristiques structurelles générales (Mercer and Unutmaz, 2009). En 2003, il a été découvert que FoxP3 est exprimé dans 5 à 10% des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> périphériques murins et dans 1% des LT humains.

##### 1.2. Structure

Le gène FOXP3, se trouve au niveau du bras court du chromosome X et possède 11 exons, il mesure 21 Kb, qui code pour une protéine de 47 kDa composée de 431 acides aminés (figure 1), est un membre de la sous-famille P de la famille des protéines FOX. Ces protéines partagent un domaine de liaison à l'ADN préservé, connu sous le nom de fourche / hélice ailée, qui contient trois hélices  $\alpha$  et deux grandes boucles qui ressemblent aux doubles ailes des papillons (Kaufmann and Knöchel, 1996).

Dans la partie C-terminale, FoxP3 possède un domaine central, qui englobe les régions de doigt de zinc (ZnF) et de fermeture éclair leucine (LeuZip), ces deux régions sont considérées comme des domaines d'interaction protéique responsables de la formation d'oligomères essentiels pour la fonction de FOXP3. Un domaine répresseur à l'extrémité N-terminale riche en proline joue un rôle crucial dans la répression des gènes cibles FoxP3 grâce à son interaction avec les facteurs de remodelage de la chromatine.



**Figure 1** : structure de FOX-P3(Pereira et al., 2017).

### 1.3. Signalisation, fonctions et régulations de FoxP3

L'induction de FoxP3 est initiée suite à la présentation de peptides dérivés d'autoantigènes (PDAA) par l'interaction du récepteur des lymphocytes T avec le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (TCR-MHC II) sur des cellules présentatrices d'antigènes (APC). Les stimuli alternatifs incluent les cytokines transformant le facteur de croissance (TGF- $\beta$ ), l'interleukine (IL) -2. FOXP3 interagit avec les facteurs de remodelage de la chromatine (TIP60 et HDAC7), ce qui facilite la dynamique avec les gènes cibles et empêche l'interaction des facteurs de transcription [facteur nucléaire kappa B (NF- $\kappa$ B) et facteur nucléaire des cellules T activées (NFAT)] avec des cytokines activatrices des gènes de la réponse cellulaire (IL-2, IL-4 et INF- $\gamma$ ), en favorisant l'expression des gènes régulateurs des lymphocytes Treg(Pereira et al., 2017).

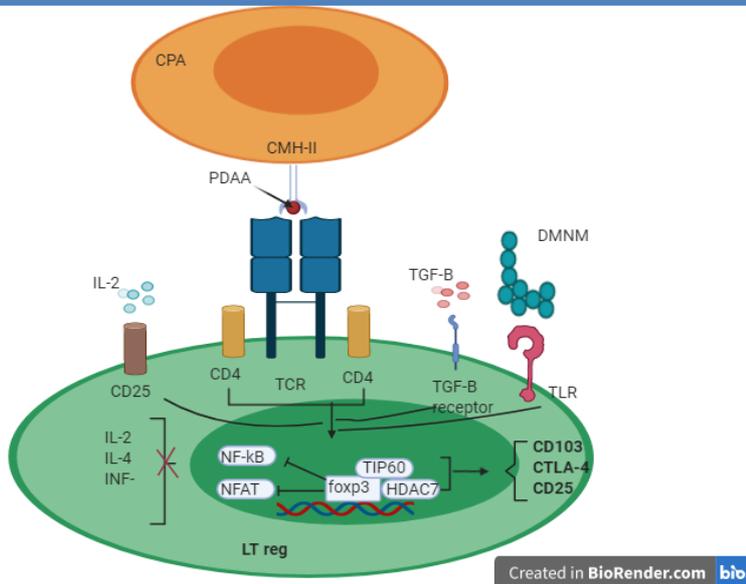
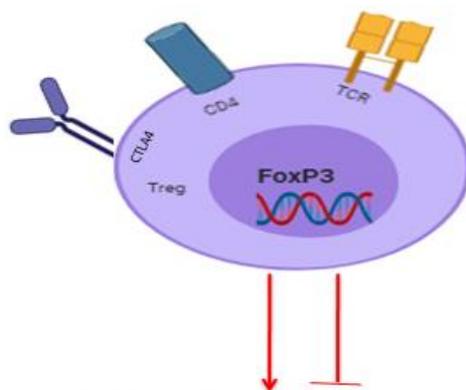


Figure 2 : cascade de signalisation de FOXP3 (Pereira et al., 2017).

Des études ont démontré une relation entre FoxP3 et Treg. Le transfert rétroviral de FOXP3 vers les cellules  $CD4^+ CD25^- T$  les a converties en un phénotype régulateur similaire à la lignée naturelle. Ces cellules présentaient une faible sécrétion d'IL-2, IL-4 et d'interféron ( $IFN-\gamma$ ) après stimulation et régulation de l'expression de marqueurs de surface Treg typiques, tels que  $CD25$ , cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 ( $CTLA4$ ). Donc le FOXP3 joue un double rôle en tant que represseur quand il interagit avec les facteurs de transcription NFAT et le facteur nucléaire kappa B (NF- $\kappa$ B) et bloque l'expression des gènes codant pour les cytokines (Bettelli et al., 2005), et activateur si FOXP3 régule l'activation transcriptionnelle d'une manière directe ou indirecte.



La transcription en fonction de ces interactions ac d'autre FT

L'activité suppressive des cellules Treg présente l'activation de nbrx gènes y compris CTLA4 par FoxP3

Figure2.1:fonction de FoxP3

Le TGF- $\beta$  est capable d'induire l'expression de FoxP3 et de conférer une activité de suppression fonctionnelle aux lymphocytes T initialement à partir d'une lignée non régulatrice. Il induit également la sécrétion d'IL-10, qui est liée à la génération des Treg périphériques (pTreg). Ces données suggèrent que le TGF- $\beta$  soutient les réseaux de régulation par la modulation de l'expression de FoxP3 et le développement de lymphocytes Treg. De plus, IL-2 soutient la fonction et la survie des Treg grâce à l'induction de *FOXP3*, en interagissant avec TGF- $\beta$ . IL-2 augmente l'expression des marqueurs Treg, tels que CD25, CTLA-4. À son tour, le facteur de nécrose tumorale des cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ ) pourrait influencer directement la fonction Treg par l'induction de l'expression de la protéine phosphatase 1 (PP1), qui déphosphoryle le domaine de la tête de fourche FOXP3 et modifie sa fonction transcriptionnelle (Nie et al., 2013).

## II. Lymphocytes T régulateurs

L'évolution du système immunitaire est une clé pour une défense efficace de l'hôte contre les agents infectieux mais ce dernier doit être strictement réglementée pour éviter une auto-immunité contre le soi. Les LT auto-réactifs pourraient être éliminés grâce à un mécanisme intrinsèque cellulaire appelé «tolérance centrale». un mécanisme supplémentaire de régulation immunitaire par lymphocytes T régulateurs (cellules Treg) est devenu un axe majeur de la recherche immunitaire ces dernières années.

### 1. Généralité

#### 1.1. Définition

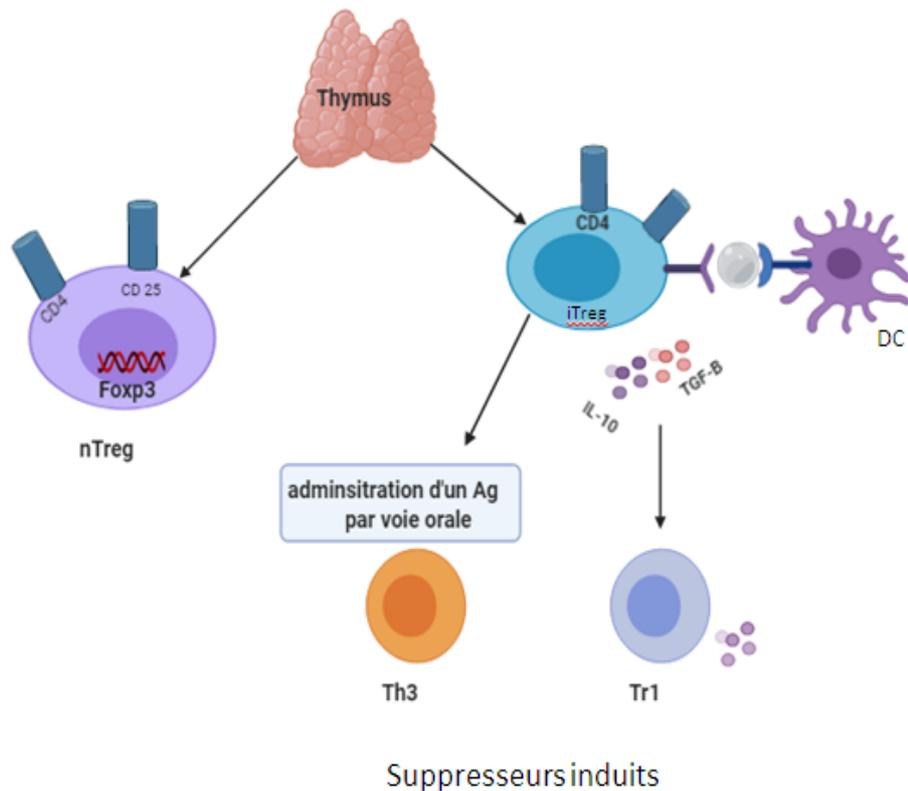
Les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont un sous-ensemble spécialisé de cellules T qui induisent la suppression de la réponse immunitaire contre les agents non infectieux, et les auto-antigènes. Ils ont été identifiés par une expression élevée de la chaîne alpha du récepteur IL-2 (CD25). Ainsi les Treg maintiennent l'auto-tolérance en supprimant l'activation et l'expansion des cellules auto-réactives (Siri et al., 2012).

#### 1.2. Diversité phénotypique des cellules T régulatrices

Il existe deux sous-ensembles distincts de Treg :

La première population de cellules résidentes qui se forment le long de la thymopoïèse, résultant en une population naturelle de Treg dérivé du thymus (tTreg). Ces cellules proviennent de la différenciation de cellules T naïves stimulées *par* le TCR ou de précurseurs fonctionnellement matures qui n'expriment pas le CD25 ou perdent leur capacité à l'exprimer comme moyen de conserver leur fonction de suppression, bien que ils peuvent l'exprimer à nouveau après stimulation par les antigènes et l'IL-2, se réactivant ainsi en tant que Treg. une fois transférés en périphérie où elles remplissent leur fonction de suppresseur, étant essentiellement costimulées par le CD28 pour maintenir la survie cellulaire et l'homéostasie.

Le deuxième sous-ensemble est formé par une population périphérique de Treg qui induit un phénotype régulateur dans les organes lymphoïdes périphériques dans des conditions spécifiques. La plupart des pTreg expriment des marqueurs tel que CD4, CTLA-4, la protéine liée à la famille des récepteurs du TNF et des niveaux élevés de *CD25* (*CD25<sup>élevé</sup>*), et les deux populations expriment *FOXP3* (Pereira et al., 2017).



**Figure 3 :**Diversité phénotypique des cellules T reg(Pereira et al., 2017).

- Les Treg de type 1 (Tr1) sont l'une des populations les plus courantes de pTreg. Ils ont un profil cytokinique caractérisé par la sécrétion des cytokines IL-10, IFN- $\gamma$ , et TGF- $\beta$  et une faible production d'IL-2. L'anergie et la faible prolifération cellulaire sont attribuées à l'IL-10, qui, avec l'IFN- $\alpha$ , contribue de manière synergique à la différenciation des cellules Tr1 (Levings et al., 2001).
- La deuxième population la plus fréquente de pTregest les cellules Th3. Cette population provient des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> stimulés par TGF- $\beta$  et joue un rôle central dans la tolérance orale aux antigènes non auto-actifs par la sécrétion d'IL-10 et de TGF- $\beta$  (Wan and Flavell, 2007).

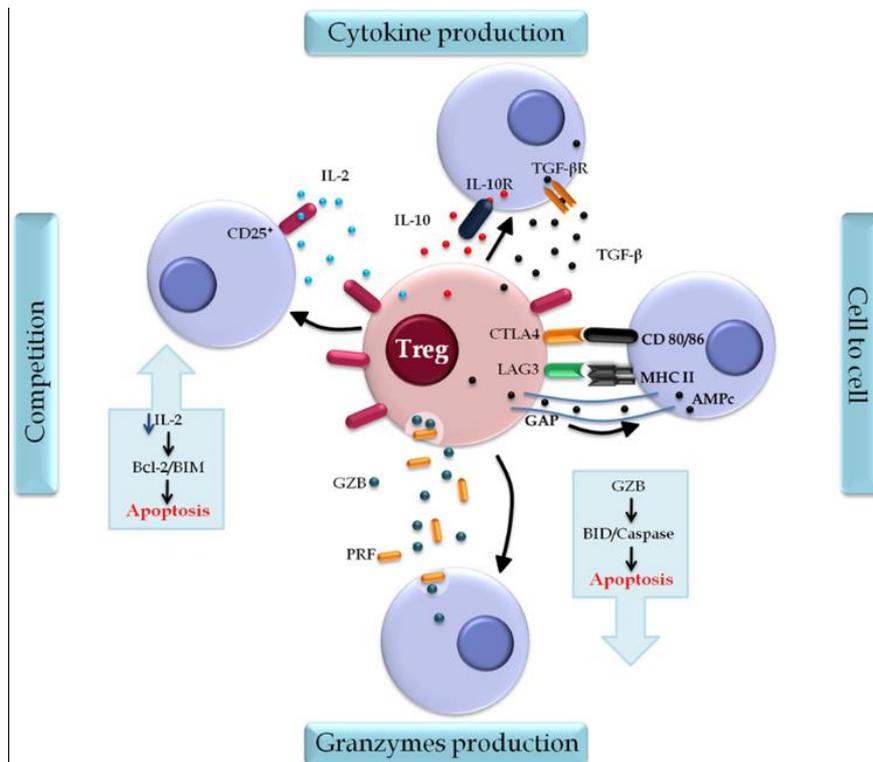
### 1.3. Mécanismes d'action des cellules T régulatrices

Les Treg induisent une suppression immunitaire par quatre mécanismes classiques:

1. le contact cellule-cellule qui est médié par des marqueurs de surface associés au CTLA-4 et au gène d'activation lymphocytaire 3 (LAG-3) qui interagissent,

respectivement, avec molécules CD80 / 86 et CMH II sur les cellules cibles, régulant la fonction cellulaire.

2. L'AMP est également un médiateur de ce mécanisme, qui est libéré directement par les jonctions lacunaires et inhibe la prolifération et la différenciation de la cellule cible.
3. La Production de cytokines, dans laquelle le TGF- $\beta$  et IL -10 modulent l'activation et la fonction de Treg. La compétition pour les facteurs de croissance, en particulier IL-2, l'expression constitutive du CD25 sur Treg et leur privation induisent l'apoptose de la cellule cible par la voie de la protéine B lymphome 2 (Bcl-2) / BIM.
4. Un quatrième mécanisme se trouve dans les lignées de type 1 Treg qui secrète le granzyme B (GZB) et la perforine (PRF) qui agissent spécifiquement dans les précurseurs myéloïdes. L'activité cytolytique de GZB dans les cellules cibles induit l'apoptose par les caspases ou la voie BID.



**Figure 4** : Mécanismes d'action des cellules T régulatrices (Pereira et al., 2017)

### 1.4 Lymphocytes Tregs dans le cancer

Les Tregs jouent un rôle dans le procédé d'immunosurveillance, gênant parfois l'éradication efficace des tumeurs.

## Chapitre 1. Revue de la littérature

---

Dans le cancer ovarien et de non-petit-cellule de poumon (NSCLC), des plus grands niveaux de Tregs ont été détectés dans la circulation. Ils ont empêché la prolifération d'autres types de cellules de T et de production d'IFN- $\gamma$  qui déclenche la réaction du système immunitaire adaptatif. Des résultats similaires ont été vus dans le cancer du sein, et dans le cancer du côlon.

CD4+CD25+ Tregs, suppriment la cytotoxicité communiquée par les cellules NK dans le cancer du poumon, du sein, et dans le cancer colorectal.

### 1.5 Mécanismes de suppression des cellules Treg

Les cellules Treg exercent leur fonction immunosuppressive à travers plusieurs mécanismes, tels que la suppression de la fonction APC par le CTLA - 4, la production de

cytokines immunosuppressives et la production de métabolites immunosupresseurs (Ohue and Nishikawa, 2019).

#### 1.5.1 Alteration des Cellules dendritiques via CTLA - 4

L'antigène 4 des lymphocytes T cytotoxiques (CTLA-4) exprimé par les cellules Treg altère la maturation des CPA, tels que les Cellules dendritiques (DC)(Maeda et al., 2014). Le CTLA - 4 se lie au CD80 / 86 sur les APC avec une affinité plus élevée que le CD28, inhibant ainsi les signaux costimulateurs. De plus, le CD80 / 86 lié au CTLA - 4 peut être physiquement transféré des CPA à la surface ou au cytoplasme des cellules Treg par trogocytose(Qureshi et al., 2011).

#### 1.5.2 Implication des cytokines

Les lymphocytes T régulateurs expriment fortement le CD25 (chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2), l'administration d'IL-2 via des récepteurs IL-2 de haute affinité limitent la prolifération / activation des lymphocytes T (chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL- 2), L'administration d'une dose élevée d'IL-2 neutralise les fonctions suppressives des cellules Treg. Ces derniers inhibent l'activation des cellules T effectrices par la production des cytokines inhibitrices, telles que le TGF- $\beta$ , l'IL-10 et l'IL-35. De plus, les substances cytotoxiques (la perforines et le granzymes) produites par les cellules Treg, tuent les cellules T effectrices (Cao et al., 2007).

**1.5.3 Implication des checkpoints**

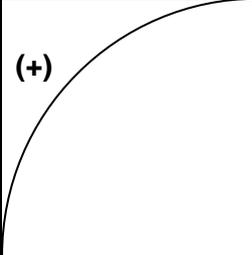
Les checkpoints sont exprimées par les cellules eTreg activées bien connues CTLA - 4, ICOS et le gène d'activation des lymphocytes - 3 (LAG - 3), qui inhibent la prolifération des cellules T effectrices et la fonction cytotoxique. Le PD-1 est aussi exprimé par les cellules eTreg activées ainsi que les cellules T effectrices qui inhibe l'activation excessive des cellules T conventionnelles en supprimant le TCR et la signalisation costimulatrice CD28 et les rend dysfonctionnelles ou épuisées. Compte tenu du niveau d'expression similaire de PD-1 par les cellules Treg dans le TME et de la dépendance similaire des signaux TCR et CD28 pour leur survie et leur fonction, l'inhibition de PD - 1 pourrait potentialiser l'activation et la fonction immunosuppressive des cellules Treg (Kamada et al., 2019).

**1.5.4 Implication des métabolites immunosuppresseurs**

L'indoléamine 2, 3 -dioxygénase (IDO), une enzyme essentielle dans la voie kynurénine du métabolisme du tryptophane, et le tryptophane 2, 3 -dioxygénase (TDO) appauvrissent le tryptophane dans le microenvironnement tumoral (TME) et provoquent un dysfonctionnement des lymphocytes T (Uyttenhove et al., 2003). L'interaction entre CTLA-4 et CD80 / 86 favorise la sécrétion d'IDO. De plus, les cellules Treg sont plus sensibles au stress oxydatif que les cellules T effectrices car les cellules Treg ont une expression plus faible de NRF2, qui est un facteur de transcription clé pour les réponses antioxydantes.

**Tableau 1 :** Effets négatifs(-) et positifs(+) des principales cellules immunosuppressives.

Cellules	Molécules	Cibles	Effets
(-)  Treg naturel	Perforine / granzyme CTLA-4 sur CD80 et CD86 Fas / FasL Adénosine  TGF-β	T effecteurs Cellules dendritiques  T effecteurs T effecteurs  Th17	Lyse. Diminution des fonctions activatrices. Apoptose. Inhibition de la production de cytokines. Apparition de CD39 et CD 73.

Treg induit	IL-2 IL-10 TCF-β	T effecteurs NK, cellules dendritiques, macrophages. Th17	Diminution de la prolifération. Diminution de CD80 et CD86. Apparition de CD39 et CD73.
 Treg	IL-21	T CD4 NK T CD8 cytotoxiques T effecteurs Th17	Limiter l'inflammation Limitent la reponse antimicrobienne. Augmentation des fonctions antitumorales Augmentation de la production d'IFN-γ et de TNF-α.  Diminution de la production d'IL-17.

### 1.6 Inhibition des cellules T régulatrices

Les Treg jouent un rôle dans la suppression des réponses immunitaires, le maintien de la tolérance immunitaire et la prévention de l'auto-immunité. L'infiltration des Treg dans le microenvironnement tumoral en cas d'un cancer a été associée à un mauvais pronostic et à de mauvaises réponses à l'immunothérapie. bien qu'elle soit également associée à une augmentation de l'auto-immunité, il a été démontré que l'élimination des Treg améliore les réponses immunitaires anti-tumorales chez des modèles animaux (Takeuchi and Nishikawa, 2016).

Le traitement avec l'anticorps anti-CTLA-4 qui est fortement exprimé sur les Tregs s'est avéré épuiser les Tregs par un mécanisme qui dépend des macrophages résidents. Cependant, il a également été démontré qu'une thérapie tumorale améliorée médiée par l'anticorps anti-CTLA-4 dépend de l'interaction avec les Tregs et les effecteurs T afin d'obtenir une protection complète contre les tumeurs (Simpson et al., 2013).

### III. Cellules B régulatrices

#### 1. Définition

Les cellules B assurent une immunité humorale en sécrétant des anticorps spécifiques contre les agents pathogènes, ils sont aussi impliqués dans l'immunité cellulaire en fournissant des signaux de costimulation qui favorisent la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en sous-ensembles Th1 ou Th2. Une fonction anormale des cellules B peut également favoriser le développement d'une auto-immunité. Un sous ensemble des lymphocytes B a été démontré par Mizoguchi en 2002 appelées cellules B régulatrices, cette catégorie est identifiée par la sécrétion d'IL-10.

Le rôle des cellules B régulatrices a été montré dans des études sur des modèles murins dépourvus de cellules Breg ou sains, les souris dépourvus des LBreg ont développé une encéphalomyélite auto-immune expérimentale et de la sclérose en plaques en comparaison avec les souris sains qui ont exercé une suppression des réponses auto-réactives pathologiques. (Mauri and Bosma, 2012).

A cet égard les lymphocytes B régulateurs jouent un rôle critique dans l'immunosuppression et dans l'immunomodulation. (Zhang et al., 2015).

#### 2. L'ontogenèse des lymphocytes B

Les LB se développent et se différencient à partir des cellules souches hématopoïétiques pluripotentes au niveau de la moelle osseuse (Figure 5). grâce aux signaux émis par les cellules stromales, les progéniteurs des LB vont subir une série de transformations (cellules pro-B précoces, cellules pro-B tardives, grandes cellules pré-B, petites cellules pré-B, cellules B immatures) au cours desquelles le BCR va progressivement se mettre en place suite aux réarrangements des différents gènes de la région variable des immunoglobulines. Les cellules B immatures vont alors migrer vers les organes lymphoïdes secondaires (OLS), sous le nom de LB transitionnels (CD24<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> IgD<sup>+/-</sup>) et subiront deux destins distincts:

- Une partie des cellules transitionnelles va se retrouver dans les structures extrafolliculaires des OLS, où deux populations se distingueront, l'une se situe dans la zone marginale (LB de la zone marginale = MZ LB CD5<sup>-</sup>) où les LB se différencient en plasmocytes sécrétrices d'anticorps T-indépendants de faibles affinités. L'autre se situe dans la zone du manteau, où les LB exprimant le marqueur CD5<sup>+</sup> sont appelés cellules B-1a producteurs d'anticorps polyréactifs.

## Chapitre 1. Revue de la littérature

- Les autres cellules transitionnelles vont se différencier en cellules folliculaires conventionnelles LB mature 1 = Bm1 (IgD+ CD38-) qui vont soit se transformer en cellules Bm2 (IgD+ CD38+) précurseurs de cellules sécrétrices d'IgM, soit former des centres germinatifs en présence de LT et de cellules dendritiques.

A l'intérieur de ces structures, les cellules activées Bm2' (IgD+ CD38fort) suite à une reconnaissance antigénique T-dépendante vont subir des hypermutations somatiques et des commutations de classe aux stades Bm3 (centroblastes) et Bm4 (centrocytes) (IgD- CD38fort) permettant d'accroître l'affinité de leur BCR. Elles termineront leur destin en se différenciant soit en cellules B mémoires soit en plasmocytes sécréteurs d'anticorps de hautes affinités.

L'ontogénèse est bien évidemment un processus contrôlé par notre système immunitaire. A chaque grande étape de différenciation et de maturation, des processus de tolérance s'opèrent afin de limiter l'apparition de LB autoréactifs.

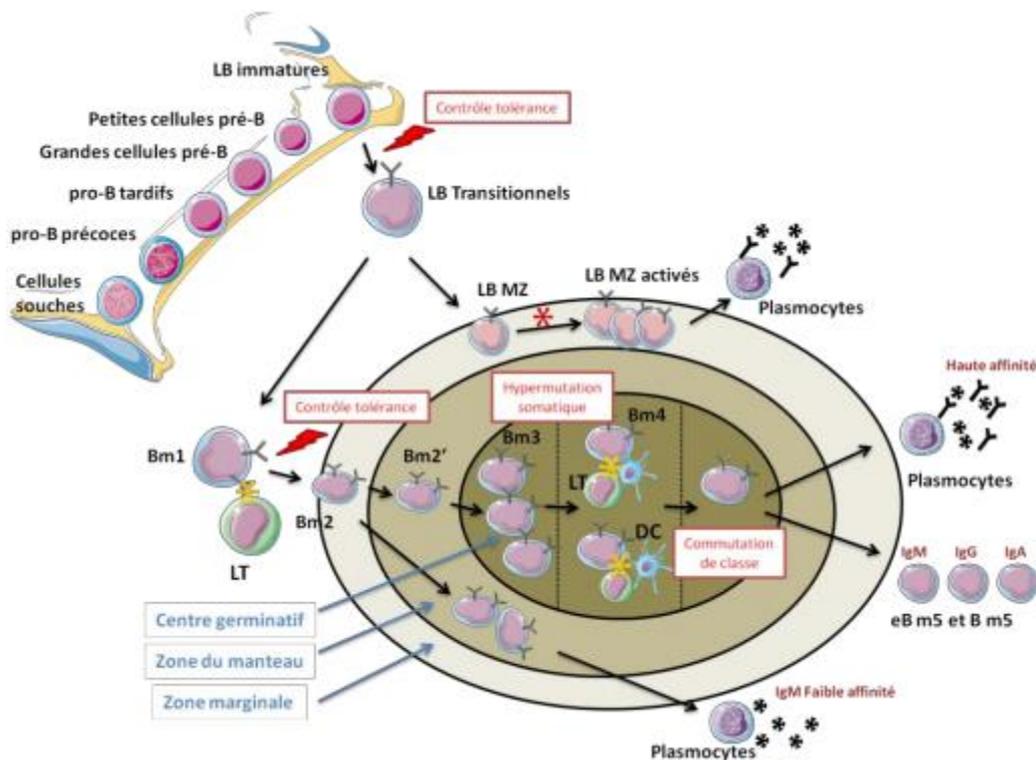


Figure 5 :L'ontogénèse des cellules B.

### 3. Phénotypes et sous-ensembles des Bregs

Une variété de sous-ensembles de Breg sont caractérisés à la fois par un phénotype et un mécanisme de suppression, principalement dépendant de l'IL-10.

## Chapitre 1. Revue de la littérature

**Tableau.2 :** les sous-ensembles des phénotypes des celluleB régulateurs (Mauri and Bosma, 2012)(Mauri and Menon, 2015)(Lykken et al., 2015).

Sous-type de cellules B régulatrices	Phénotypes	Mécanisme de suppression	Fonctions	Maladies
Cellules B10	CD19 <sup>+</sup> CD24 <sup>hi</sup> CD27 <sup>+</sup>	IL-10	Suppriment la production de TNF-a par les monocytes.	Augmentation de nombre de cellule B10 pro dans les patients atteints de sclérose en plaques, de lupus systémique, de polyarthrite rhumatoïde, de syndrome de Sjögren et de maladie cutanée vésiculobulleuse auto-immune.  suppriment également les réponses immunitaires antitumorales donc développent une cible thérapeutique idéale
Cellules B immatures	CD19 <sup>+</sup> CD24 <sup>hi</sup> CD38 <sup>hi+</sup>	IL-10, PD-L1	Stimulent la différenciation des cellules CD4 <sup>+</sup> T et reg Foxp3 <sup>+</sup> en produisant du TGF-β  Suppriment la différenciation des Th1 et Th17  Inhibe les réponses	suppriment les réponses des lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> spécifiques du VIH via le IL-10, PDL1  établient la tolérance à la transplantation en supprimant les réponses des cellules T effectrices

			th1	
Cellules GrB <sup>+</sup> B	CD19 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> CD1d <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> CD147 <sup>+</sup>	GrB, IL-10, IDO	Stimulent et activent les cellules Th.	infiltrant les tumeurs et régulent les réponses des cellules T
Cellules Br1	CD25 <sup>hi</sup> CD71 <sup>hi</sup> CD73 <sup>lo</sup>	GrB, IL-10, IDO	la tolérance aux allergènes en supprimant la prolifération des lymphocytes T CD4	
IBregs		TGF-β, IDO	la production de TGF-β et IDO et induit l'expansion des IL-10 <sup>+</sup> et TGF-β <sup>+</sup> Tregs	la limitation des réponses inflammatoires. le maintien de l'homéostasie immunitaire.

#### 4. Les mécanismes d'action des LB régulateurs

LesBreg présentent une large fonctionnalité, notamment sur l'immunité innée et adaptative.

### 1.1 Le contrôle de la réponse immunitaire adaptative

Le rôle des Breg porte essentiellement sur la suppression de la réponse Th1 et Th17 pro-inflammatoire. Un défaut en LB sécréteurs d'IL-10 entraîne une augmentation des taux de cytokines pro-inflammatoires IFN- $\gamma$  et IL-17 associée à un développement exacerbé de la pathologie auto-immune.

Le contact cellulaire via les molécules de co-stimulation CD80-CD86 semble tout aussi primordial dans l'activité régulatrice des LB. Car un blocage de ces deux protéines entraîne une augmentation des cytokines Th1 malgré la présence de l'IL-10.

De plus, il est à noter que les Breg peuvent inhiber la prolifération des LT par contact direct CD40-CD40L sous l'action du TGF- $\beta$ , indépendamment de la présence d'IL10. Au delà des pathologies auto-immunes et inflammatoires, les Breg jouent également un rôle essentiel dans la tolérance chez des individus greffés.

Récemment, il a été démontré que les Breg sont capables d'inhiber la réponse auto-immune en produisant de l'IL-35, chez un modèle murin.

La réponse immunitaire humorale peut également être contrôlée par les Breg. Les LB stimulés par TLR-9 et CD40 ont la capacité de réguler la maturation des LT en LTh, ainsi à inhiber la différenciation des LB en LB mémoires et en plasmocytes.

### 4.2 Le contrôle de la réponse immunitaire innée

Le contrôle de la réponse immunitaire se fait par la modulation de certaines cellules de l'immunité innée.

Les LB contribuent au maintien de la tolérance dans l'auto-immunité en activant la prolifération et l'activation des cellules NKT. La perte exclusive de l'expression du marqueur de surface CD1d sur les LB, provoque une déficience en LB avec une baisse du pourcentage de NKT dans le sang des patients.

Neves et al ont démontré que chez des souris MyD88-/- déficientes en Breg, il ya un enrichissement en cellules NK IFN- $\gamma$ + et en neutrophiles sécréteurs de TNF- $\alpha$ .

Les Breg peuvent aussi supprimer la fonction tueuse des cellules NK.

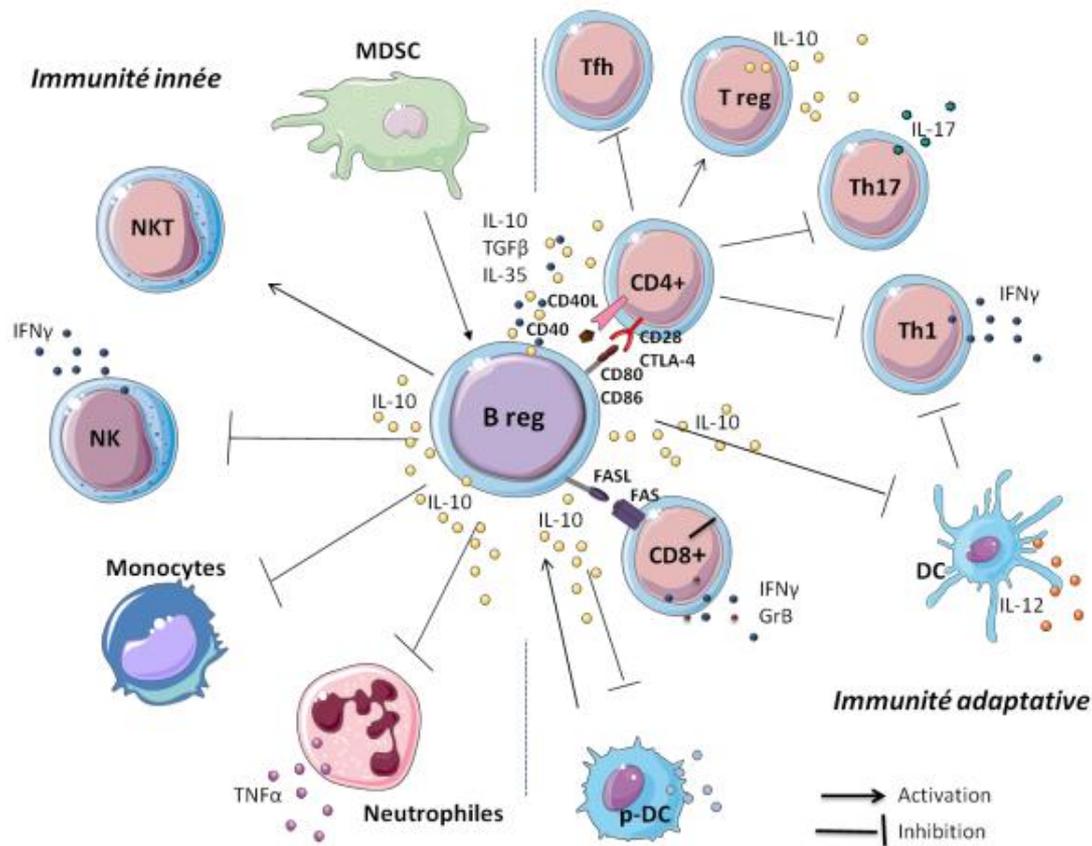


Figure 6 : Les mécanismes de contrôle de la réponse immunitaire par les LB régulateurs.

## 5. Mécanisme suppressifs des cellules Breg

Malgré les différences phénotypiques des cellules Breg, principalement celles produisant de l'IL-10, exercent une fonction suppressive sur le rôle crucial de cette cytokine (Saraiva and O'Garra, 2010).

### a) Suppression dépendante de l'IL-10

L'activation de cellules B T2-MZ par des ligands TLR (principalement TLR2, TLR4, TLR9) provenant de pathogènes induit la synthèse d'IL-10 (Figure7). Ces cellules B se différencient en Breg, le long de la progression de l'inflammation, les Bregs reçoivent des signaux d'activation, via BCR, CD40 et CD86 / CD80, et régulent positivement la production d'IL-10. Dans cette étape, la reconnaissance de l'antigène par BCR est nécessaire. Dans le microenvironnement conditionné par IL-10, la synthèse des cytokines par les cellules Th1, Th17 et les monocytes peut être supprimée ou / et des cellules Treg peuvent être générées (pTreg ou Tr1) et impliquées dans l'inhibition des maladies auto-immunes.

## Chapitre 1. Revue de la littérature

Les mécanismes de suppression dépendants de l'IL-10 sont liés à l'inhibition de la production de chimiokines (IFN- $\gamma$ ) par les cellules cytotoxiques T CD8 et de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ ) par les monocytes entraînant l'inhibition des réponses anti-tumorales. (Bocian et al., 2017).

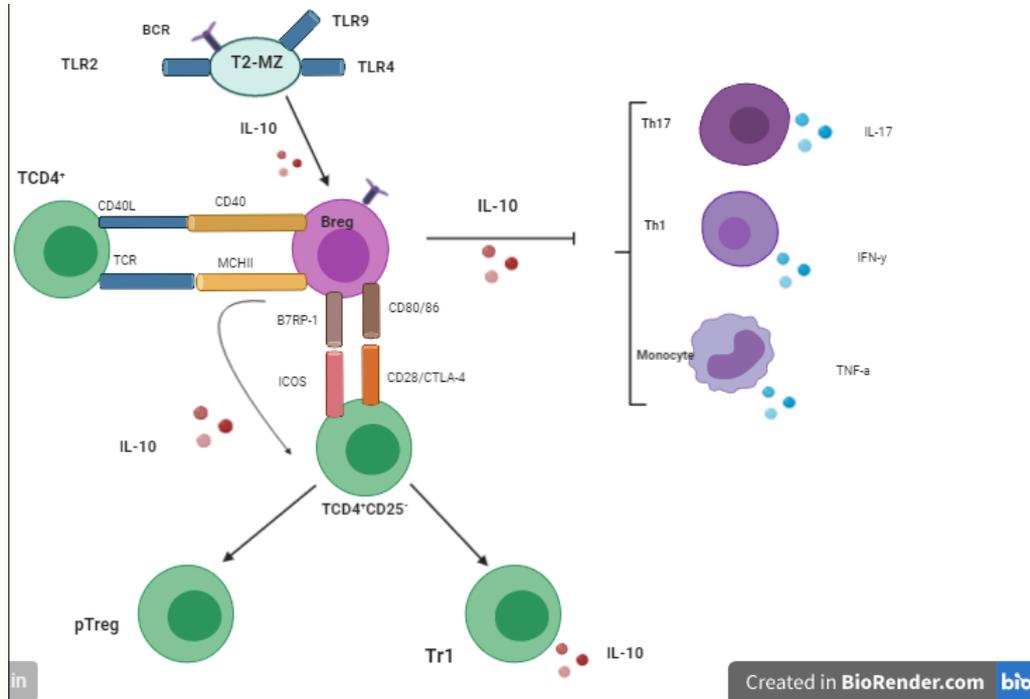


Figure 7 : Suppression dépendante de l'IL-10

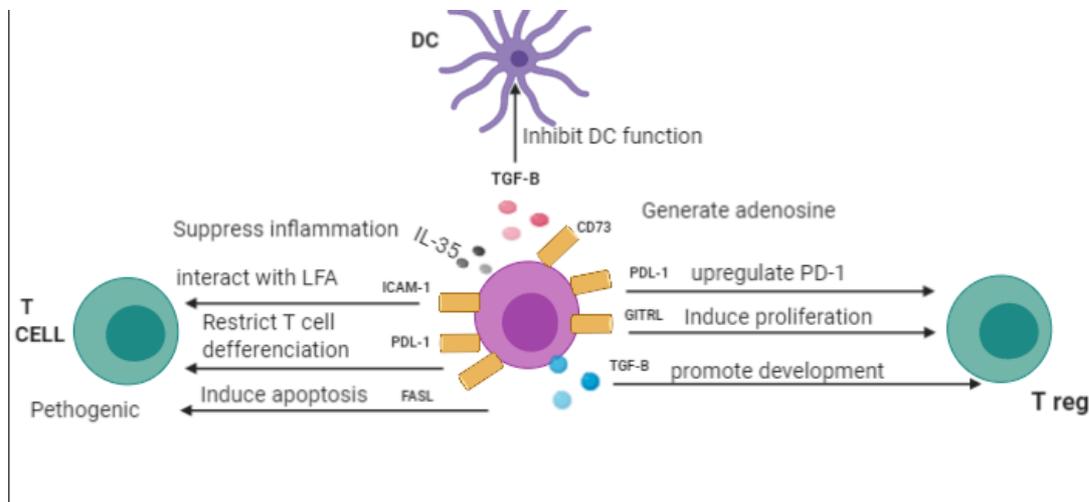
### b) Suppression indépendante de l'IL-10

Bien que la production d'IL-10 soit considérée comme une caractéristique de la fonction régulatrice des lymphocytes B, d'autres mécanismes de suppression, indépendants de l'IL-10, ont également été pris en considération (Figure 8). Les Bregs peuvent supprimer la fonction des cellules T pathogènes par les interactions IL-35, ICAM-1 / LFA-1, Fas / FasL (Fas ligand) ou PD-L1 / PD-1. la génération de TGF- $\alpha$  par Bregs inhibe la fonction des cellules dendritiques et induit la génération de Treg. L'inhibition de diverses fonctions des

cellules immunitaires par induction du développement des Treg ou modulation de l'activité suppressive du Treg. (Bocian et al., 2017).

Il a été démontré que les bregs génèrent de l'adénosine, qui joue un rôle anti-inflammatoire contrairement à l'ATP extracellulaire. Les bregs expriment les ectoenzymes CD39 et CD73, qui sont les principales enzymes métabolisant les nucléotides. Le CD39 catalyse la dégradation de l'ATP extracellulaire en ADP et en AMP, suivie de la conversion de l'AMP en CD73 en adénosine (Kaku et al., 2014).

Tous les mécanismes de suppression indépendants de l'IL-10 sont actuellement étudiés en immunothérapies ciblant les cellules B (Ray et al., 2015). En comparant la fonction régulatrice de différents sous-ensembles de cellules B régulatrices, leur activité dépendante de l'IL-10 consiste principalement à inhiber les cellules T effectrices ou les monocytes en limitant la synthèse de cytokines particulières et à induire la différenciation des cellules T régulatrices, tandis que la suppression indépendante de l'IL-10 est liée à l'expansion des Tregs existants, à l'induction de nouveaux Tregs et, dans une moindre mesure, a un effet direct sur les cellules T pathogènes cibles.



**Figure 8 :** Suppression indépendante de l'IL-10

### 6. LBreg et réponses anti tumorales

La fonctionnalité des Breg dans les cancers diffère peu de celle retrouvée dans les pathologies auto-immunes et inflammatoires.

De nombreuses études ont démontré un développement rapide de la tumeur chez des souris contrôles par rapport à des souris déficientes en LB après transfert de cellules cancéreuses. L'absence de LB chez ces souris est liée d'une part avec une diminution des Treg Foxp3+, et d'autre part à une augmentation de la réponse anti-tumorale Th1 (sécrétion accrue d'IFN- $\gamma$ ) et de l'activité cytotoxique des LT CD8+ (production exacerbée de granzyme B et d'IFN- $\gamma$ ).

En 2013 et pour la première fois Chez l'Homme, une population de Breg a été identifiée dans le microenvironnement tumoral de différents cancers solides (ovariens, poumons...). Leur activité repose sur la sécrétion de granzyme B et d'IL-10 sous la stimulation d'IL-21 (produite par les LT CD4+) permettant l'inhibition de la prolifération des LT.

L'absence de Breg favorise donc l'activité antitumorale des LT, il ne faut toutefois pas oublier que les LB peuvent avoir un rôle très bénéfique au sein du système immunitaire et notamment en supprimant le développement tumoral par la sécrétion d'anticorps, la présentation d'antigène ou encore par le déclenchement direct de processus de mort cellulaire. Les mécanismes responsables de l'orientation des LB vers l'une ou l'autre de ces activités restent inconnus (Kaplon and Dieu-Nosjean, 2018).

### IV. PCR

#### 1. Définition

La PCR est une méthode enzymatique pour l'amplification exponentielle de fragments d'ADN spécifiques in vitro. L'amplification est un processus exponentiel et une technique très sensible pour détection de l'acide nucléique(ADN).

#### 2. principe

La technique PCR se base sur le principe suivant:

- \* Connaître d'abord les fragments (20 nucléotides)
- \* Synthèse de séquences complémentaires à ces fragments : ce sont les amorces Oligonucléotidiques.
- \* L'ADN polymérase commence la synthèse des brins complémentaires grâce aux amorces et le nombre de copies de la séquence d'ADN est doublé pour chaque réplication.

#### 3. Acteurs de la PCR:

- **L'ADN:** Généralement sous forme de double-hélice, il contient le fragment à amplifier.
- **Deux amorces, sens et anti-sens:**

Ce sont des petits brins d'ADN d'environ 20 bases,(Appelésoligo nucléotides) capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à lacomplémentarité des bases, sur le brin d'ADN ou sur son brin complémentaire. Lesamorces sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier.

- **Une enzyme :**

La Taq Polymerase (Taq P01), une ADN polymérase thermorésistante extraite de la bactérie *Thermus aquaticus*. Sa température optimale d'action est de 72°C et elle est capable de résister à des passages successifs à 95°C, ce qui a rendu possible l'automatisation de la procédure.

- **Les Nucléotides :**

## Chapitre 1. Revue de la littérature

DGTP, dATP, dTTP, dCTP, appelés globalement dNTPs (DésoxyNucléotides-Tri-Phosphates), qui sont les éléments de base utilisés par la Taq Pol pour synthétiser les brins d'ADN complémentaires.

### 4. Etapes de PCR

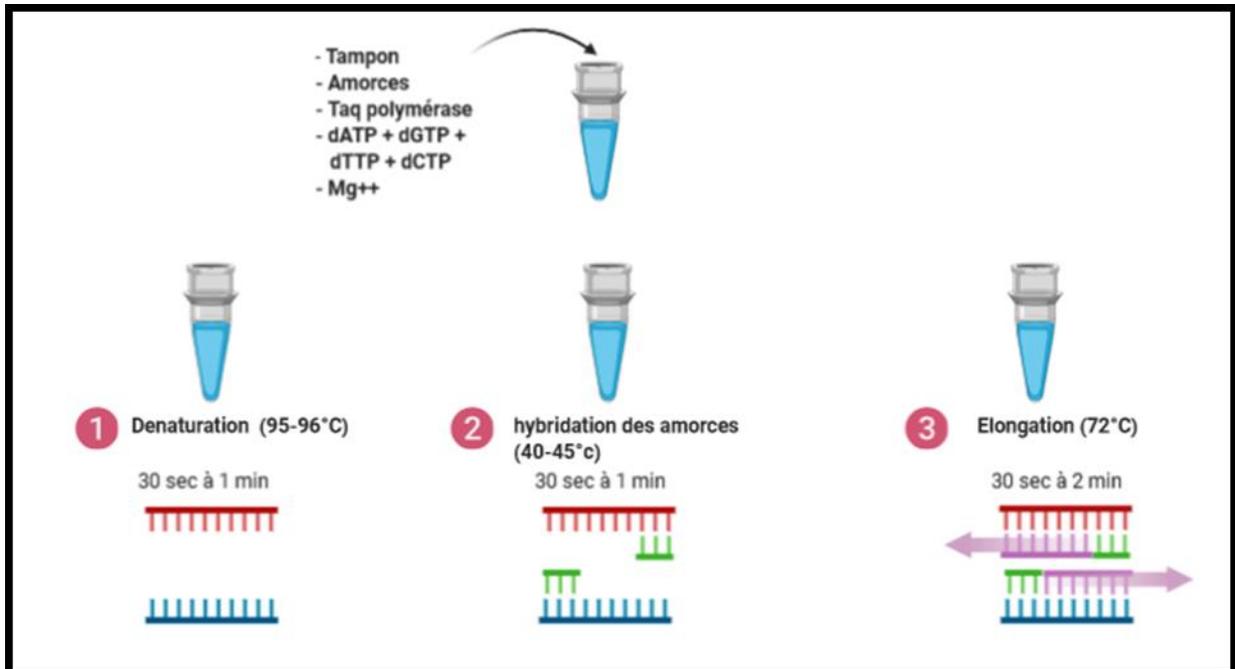


Figure 1.10. Etapes et principe de la PCR.

- **Etape 1 :**

Une fois tous les éléments rassemblés, l'ADN à amplifier est chauffé jusqu'à 90°C pendant 30 secondes à une minute pour séparer ses deux brins.

- **Etape 2 :**

Le tube est refroidi à environ 50°C (température calculée en fonction de la séquence des amorces). Cette température va permettre l'hybridation des deux brins d'ADN avec les deux amorces.

- **Etape 3:**

Synthèse des brins complémentaires par la Taq polymérase.

-Les trois étapes forment un cycle. La PCR se fait entre 30 et 40 cycles.

-Le nombre de copies de la séquence à amplifier dépend du nombre de cycles à réaliser.

-Puisque à chaque cycle, le nombre de copies est multiplié par deux, on aura alors un nombre égal à  $2^n$  après  $n$  cycles (**LA TECHNIQUE D'AMPLIFICATION *IN VITRO* PCR**)

## Chapitre 1. Revue de la littérature

---

-Concernant la troisième étape de chaque cycle, des durées de plusieurs minutes peuvent être nécessaires pour les fragments plus longs (2 à 3 Kb, ou les fragments de 3 à 40 Kb dans la longue PCR « ou long PCR ») : surtout les fragments riches en bases G et C.

## 2. Amorces

### 2.1 Définition

Les amorces sont des courtes séquences oligonucléotidiques d'ADN monocaténaire, utilisées lors des PCR pour initier l'amplification.

Les amorces utilisées ont une longueur de 16-30 nucléotides ce qui demande une température d'hybridation raisonnable élevée. L'extrémité 3' de l'amorce devrait être riche en base G et C pour une meilleur hybridation.

### 2.2 Caractéristiques d'une bonne paire d'amorces

- elles doivent être spécifiques à la région qu'on veut amplifier.
- longueur entre 20 et 25 nucléotides.
- 40% en CG surtout dans la région 3' (pour augmenter la stabilité puisqu'ils ont 3 liaison d'hydrogène).
- Pas de complémentarité entre l'amorce sens et anti-sens.
- Pas de complémentarité dans chacune des amorces.
- La température de fusion entre 52° et 58° (Lorenz, 2012).
- 

## 3. Banques et bases de données

### 3.1. Banque de données

La banque de données est un ensemble de données relatives à un domaine, elles sont organisées par un traitement informatique et accessibles en ligne et à distance.

Elles sont stockées sous forme d'un fichier formaté et comprennent 2 types :

- généralistes (données hétérogènes)
- spécialisées (données homogènes)

### 3.2. Base de données

La base de données est un ensemble de relations entre les données, gérées à l'aide d'un système de gestion.

Parmi les bases de données les plus utilisées :

- NCBI

- EMBL
- PDB
- SCOP

### Problématique et objectifs

#### Problématique

Les cellules régulatrices CD4<sup>+</sup> T exprimant FOXP3 (Treg) sont essentielles au maintien de l'homéostasie immunitaire, et peuvent également empêcher les réponses immunitaires contre les tumeurs et favoriser la progression tumorale, dans certains cas les cellules foxp3Treg nécessitent les Breg pour leur l'activation. Les Treg foxp3 peuvent donc être ciblés différenciellement dans la gestion des maladies auto-immunes ou du cancer via leur expression de foxp3.

#### L'Objectif

L'objectif de notre travail est de concevoir des amorces qui encadrent le FOX-P3.

#### But

.Utiliser les amorces obtenus par PCR en thérapie pour prévenir et guérir les maladies auto-immunes et les cancers

# Chapitre 2

## 2 Matériels et méthodes

# Chapitre 2

## 2. Matérielles et méthodes

### 2.1. La séquence du gène FOXP3

- Nous avons importé la séquence du gène *FoxP3* de la base de données Ensembl « [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) », en introduisant le nom du gène et la nature de l'espèce (humaine) (**Figure 2.1**).

The screenshot displays the Ensembl genome browser interface. At the top, the search bar contains 'foxp3' and the species is set to 'Human'. The search results show 63 matches, with 'FOXP3 (Human Gene)' selected. The left sidebar shows various options for displaying the gene, with 'Sequence' circled in red. The main content area shows the gene's description, location, and a list of transcripts.

**Search Results:**

- Current selection: Only searching Human
- Restrict category to: Gene (12), Transcript (36), Variant (11), GeneTree (1), Clones & Regions (1), Protein Family (2)
- Per page: 10, 25, 50, 100
- Layout: Standard, Table
- Tip: Main and Documentation can be

**Gene: FOXP3 (Human Gene)**  
 ENSG00000049768 X:49250438-49270477-1  
 Forkhead box P3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6106]  
 LRG\_62 (LRG display in Ensembl gene record; description: Locus Reference Genomic record for FOXP3) is an external reference matched to Gene ENSG00000049768  
 Variant table • Phenotypes • Location • External Refs • Regulation • Orthologues • Gene tree

**FOXP3-206 (Human Transcript)**  
 ENST00000557224 X:49251334-49264710-1  
 Forkhead box P3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6106]  
 R-HSA-8877330 (Reactome record; description: RUNX1 and FOXP3 control the development of regulatory T lymphocytes (Tregs)) is an external reference matched to Translation ENSP00000451208  
 Location • External Refs • cDNA seq • Exons • Variant table • Protein seq • Population • Protein summary

**FOXP3-207 (Human Transcript)**  
 ENST00000650877 X:49258343-49270477-1  
 Forkhead box P3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6106]  
 Location • External Refs • cDNA seq • Exons • Variant table • Protein seq • Population • Protein summary

**FOXP3-208 (Human Transcript)**  
 ENST00000651307 X:49251278-49258527-1

**Human (GRCh38.p13)**  
 Location: X:49,250,438-49,270,477 Gene: FOXP3

**Gene-based displays**

- Summary
- Splice variants
- Transcript comparison
- Orthologues
- Sequence
- Secondary Structure
- Comparative Genomics
- Genomic alignments
- Gene tree
- Gene gain/loss tree
- Orthologues
- Paralogues
- Ensembl protein families
- Ontologies
- GO: Cellular component
- GO: Biological process
- GO: Molecular function
- Phenotypes
- Genetic Variation
- Variant table
- Variant image
- Structural variants
- Gene expression
- Pathway
- Regulation
- External references

**Gene: FOXP3** ENSG00000049768

**Description** forkhead box P3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6106]

**Gene Synonyms** AIID, DIETER, IPEX, JM2, PIDX, SCURFIN, XPID

**Location** [Chromosome X: 49,250,438-49,270,477](#) reverse strand. GRCh38:CM000685.2

**About this gene** This gene has 9 transcripts ([splice variants](#)), [114 orthologues](#), [43 paralogues](#), is a member of [2 Ensembl protein families](#) and is associated with [3 phenotypes](#).

**Transcripts** [Show transcript table](#)

**Summary**

**Name** [FOXP3](#) (HGNC Symbol)

**CCDS** This gene is a member of the Human CCDS set: [CCDS14323.1](#), [CCDS48109.1](#)

**UniProtKB** This gene has proteins that correspond to the following UniProtKB identifiers: [Q9BZS1](#)

**RefSeq** This Ensembl/Genecode gene contains transcript(s) for which we have [selected identical RefSeq transcript\(s\)](#). If there are other RefSeq transcripts available they will be in the [External references](#) table

**LRG** [LRG\\_62](#) provides a stable genomic reference framework for describing sequence variants for this gene

**Ensembl version** ENSG00000049768.16

Figure 2.1: La séquence du gène *Foxp3* sur la plateforme Ensembl.



## Chapitre 2. Matérielles et méthodes

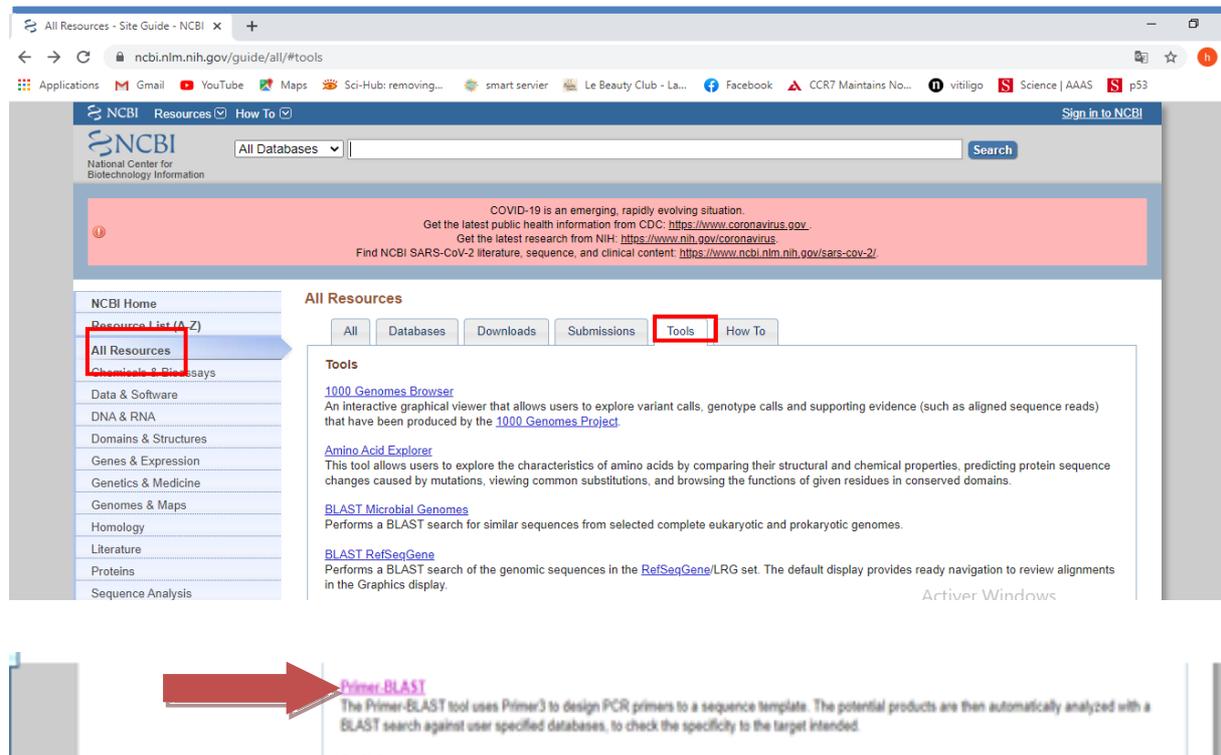


Figure 2.3 : Plateforme de la base de données NCBI.

Pour la réalisation de notre amorce, nous avons suivi les étapes ci-dessous :

- Nous avons collé notre amorce d'intérêt dans le Primer BLAST.
- Pour remplir les cases de l'amorce sens, nous sommes allés sur la page Word et nous avons dénombré les nucléotides, pour cela nous avons sélectionné le début de la séquence encadrée jusqu'au début de l'exon 06, nous avons cliqué sur révision, puis sur option statistique, et nous avons obtenu une fenêtre contenant les numéros à remplir. Et pour l'amorce anti sens, nous avons sélectionné le début de la séquence encadrée jusqu'à la fin de l'exon 06 (Figure 2.4).

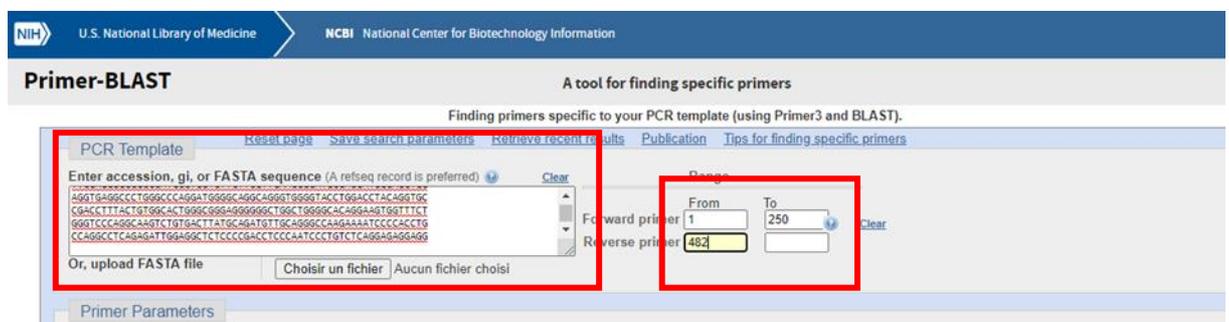


Figure 2.4 : L'outil Primer BLAST.

- Dans le paramètre « Database », nous avons choisi « **Genomes for selected organisms (primary reference assembly only)** ».

➤ Puis nous avons cliqué sur le bouton "Get Primers" pour voir les résultats (**Figure 2.5**).

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  
Enter an organism name (or organism group name such as enterobacteriaceae, rodents), taxonomy id or select from the suggestion list as you type.  
[Add more organisms](#)

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

Activer Windows  
Accédez aux paramètres pour activer Windows

**Figure 2.5** : Changements de quelques paramètres (Primer BLAST).

### 3. Résultats

#### 3.1. Résultats de primer blast

##### 3.1.1 Les caractéristiques d'une bonne paire d'amorces

- Les amorces doivent contenir de 20 à 25 nucléotides, car, plus l'amorce est longue moins l'hybridation est optimale.
- La teneur en GC doit avoisiner les 40%.
- Les températures d'hybridation de l'amorce sens et anti-sens doivent être équivalentes des unes aux autres. Pendant la réalisation de la PCR, la température d'hybridation est stable à une seule valeur.
- Tous les produits aspécifiques résultants appartenant à l'amorce souhaitée doivent contenir plus de 1000 paire de bases, alors que celle des produits spécifiques doit être inférieure à 1000pb.

##### 3.1.2 Résultats de la conception d'amorces pour le gène *Foxp3*

Les résultats obtenus à partir de ce processus sont présentés ci-dessous (**Figure 2.6**).

**Primer pair 2**

	Sequence (5'>3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCAATGCCTGCTTTGACCAG	Plus	20	147	166	59.75	55.00	6.00	3.00
Reverse primer	AGTGCCACAGTAAAGTCCGG	Minus	20	559	540	59.97	55.00	5.00	1.00
Product length	413								

Products on potentially unintended templates  
>NC\_000023.11 Homo sapiens chromosome X, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 2223  
Features flanking this product:  
[33551 bp at 5' side: probable G-protein coupled receptor 101](#)  
[499245 bp at 3' side: zinc finger protein ZIC 3 isoform 1](#)

Forward primer 1 CCAATGCCTGCTTTGACCAG 20  
Template 137065224 GTC...A..... 137065243

Forward primer 1 CCAATGCCTGCTTTGACCAG 20  
Template 137067446 GTC...A..... 137067427

product length = 1159  
Features flanking this product:  
[33605 bp at 5' side: proline-rich protein 32](#)  
[1194778 bp at 3' side: actin-related protein T1](#)

Forward primer 1 CCAATGCCTGCTTTGACCAG 20  
Template 126855139 ....A.....G.A...C 126855158

Forward primer 1 CCAATGCCTGCTTTGACCAG 20  
Template 126856297 .....T..C.A...C 126856278

>NC\_000016.10 Homo sapiens chromosome 16, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 2248

**Figure 3.1** : Résultat de primer BLAST.

#### 3.2. Interprétation des résultats

## Chapitre 3. Résultats

En utilisant Primer BLAST, nous avons obtenu 10 paires d'amorces spécifiques du gène *Foxp3*.

J'ai choisi la paire d'**amorces2** grâce à la présence des critères suivants :

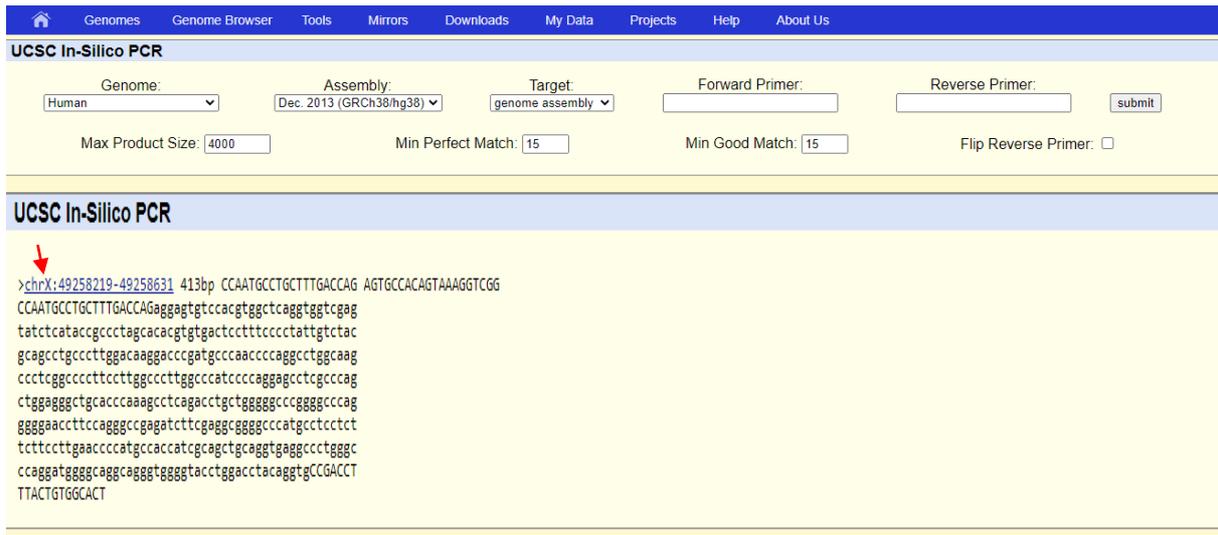
- La longueur du produit est de 413 pb (paire de bases), donc c'est un produit spécifique au gène *Foxp3*.
- La longueur de l'amorce sens 5'CCAATGCCTGCTTTGACCAG3' et de l'amorce anti-sens 5'AGTGCCACAGTAAAGGTCGG3', ne dépasse pas 20 nucléotides.
- La température de fusion, est presque similaire, 59.75°C pour l'amorce sens et 59.97°C pour l'amorce anti-sens.
- L'amorce sens et anti-sens ont un bon pourcentage en CG, 55% pour l'amorce sens et 55% pour l'anti-sens.
- L'autocomplémentarité des ces amorces est de 4 ce qui est bon pour éviter la structure d'épingle à cheveux (**Tableau 3.1**).

**Tableau 3.1. Critères de notre paire d'amorces.**

Critères d'une bonne amorce	Taux optimal	Notre amorce
Température de fusion.	52 à 58 °C	Directe 59.75 °C Inverse 59.97 °C
Longueur	15 à 30 nucléotides	Directe 20nucléotides Inverse 20nucléotides
Teneur en CG	40 à 60%	Directe 55% Inverse 55%
Amorce spécifique.	Moins de 1000 pb	413
Produits aspécifiques	Plus de 1000 pb	Tous plus de 1000 pb

### 3.3. Confirmation des résultats

La dernière étape de notre travail est de confirmer les résultats qui se fait par le logiciel « PCR In Silicon » via le site <https://genome.ucsc.edu/> qui nous a donné l'emplacement de notre produit spécifique sur le chromosome X et grâce à cela nous avons prouvé la spécificité de ces amorces.



The screenshot shows the UCSC In-Silico PCR tool interface. At the top, there is a navigation bar with links: Genomes, Genome Browser, Tools, Mirrors, Downloads, My Data, Projects, Help, and About Us. Below this, the tool title "UCSC In-Silico PCR" is displayed. The search parameters are as follows: Genome: Human (dropdown), Assembly: Dec. 2013 (GRCh38/hg38) (dropdown), Target: genome assembly (dropdown), Forward Primer: (empty text box), Reverse Primer: (empty text box), Max Product Size: 4000 (input), Min Perfect Match: 15 (input), Min Good Match: 15 (input), and Flip Reverse Primer: . A "submit" button is located to the right of the Reverse Primer field. Below the search parameters, the tool title "UCSC In-Silico PCR" is repeated. A red arrow points to the start of a DNA sequence: >chrX:49258219-49258631 413bp CCAATGCCTGCTTTGACCAG AGTGCCACAGTAAAGGTCGG. The sequence is displayed in a monospaced font, with the first line being the header and the subsequent lines being the DNA sequence.

**Figure 3.2 :** Confirmation des résultats par le logiciel PCR In Silico.

Nos résultats sont les suivants : Amorce sens 5' CCAATGCCTGCTTTGACCAG3' et Amorce antisens 5' AGTGCCACAGTAAAGGTCGG 3', nous remarquerons que la longueur de la paire d'amorces ne dépasse pas 20 nucléotides et c'est ce que nous recherchons.

Le système immunitaire a évolué des mécanismes sophistiqués pour effectuer des réponses immunitaires protectrices efficaces et pour limiter l'auto-immunité, l'inflammation excessive et la réponse immunitaire infectieuse aux allergènes conventionnels via l'activité immunosuppressive des cellules T et B régulatrices.

Les lymphocytes T régulateurs expriment le facteur de transcription FoxP3 qui est requis pour le développement et la fonction des lymphocytes T régulateurs dans différents micro-environnements.

Le développement et l'efficacité de l'activité des Tregs semblent dépendants des Bregs pour une meilleure régulation des réponses auto-immunes et anti-cancéreuses

La PCR est un test enzymatique très sensible, permettant la détection et la quantification rapide du produit (Garibyan and Avashia, 2013).

Cependant, un PCR fiable nécessite de bonnes amorces, ce qui signifie généralement une spécificité absolue au produit à détecter (Bustin and Huggett, 2017).

Nous concevons une bonne paire d'amorces pour le gène FoxP3 pour arriver à une réalisation cohérente de cette technique plus tard. Nous utilisons des outils Bioinformatiques notamment Primer Blast qui offre la possibilité de concevoir des amorces spécifiques du gène FoxP3, bien sûr en suivant un flux de travail avec soin. Nous avons obtenu les séquences d'amorces suivantes : Amorce sens : 5' CCAATGCCTGCTTTGACCAG 3' et Amorce anti-sens : 5' AGTGCCACAGTAAAGGTCGG 3' spécifiques du gène FoxP3.

En général, La conception d'amorce spécifique liée avec une réalisation fiable d'une PCR aboutissent à une compréhension meilleur de l'implication du gène FoxP3 dans la modulation des cellules Treg et Breg au cour des réponses immunitaires anti-tumorales et des processus auto-immuns.



## Chapitre 5. Conclusion

---

La conception des amorces du Foxp3 avec une amplification optimale par PCR pourrait fournir à l'avenir une thérapie utile qui cible la bonne intervention pour prévenir et guérir les maladies auto-immune et les cancers.

- Betelli, E., Dastrange, M., and Oukka, M. (2005). Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 5138–5143.
- Bocian, K., Kiernożek, E., Domagała-Kulawik, J., Korczak-Kowalska, G., Stelmaszczyk-Emmel, A., and Drela, N. (2017). Expanding Diversity and Common Goal of Regulatory T and B Cells. I: Origin, Phenotype, Mechanisms. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* *65*, 501.
- Bustin, S., and Huggett, J. (2017). qPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification* *14*, 19–28.
- Cao, X., Cai, S.F., Fehniger, T.A., Song, J., Collins, L.I., Piwnica-Worms, D.R., and Ley, T.J. (2007). Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* *27*, 635–646.
- Garibyan, L., and Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *J. Invest. Dermatol.* *133*, 1–4.
- Gottschalk, R.A., Corse, E., and Allison, J.P. (2012). Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells. *J. Immunol.* *188*, 976–980.
- Kaku, H., Cheng, K.F., Al-Abed, Y., and Rothstein, T.L. (2014). A novel mechanism of B-cell mediated immune suppression through CD73-expression and adenosine production. *J Immunol* *193*, 5904–5913.
- Kamada, T., Togashi, Y., Tay, C., Ha, D., Sasaki, A., Nakamura, Y., Sato, E., Fukuoka, S., Tada, Y., Tanaka, A., et al. (2019). PD-1+ regulatory T cells amplified by PD-1 blockade promote hyperprogression of cancer. *PNAS* *116*, 9999–10008.
- Kaplon, H., and Dieu-Nosjean, M.-C. (2018). Quel avenir pour les lymphocytes B infiltrant les tumeurs solides - Marqueur pronostique et/ou cible thérapeutique ? *Med Sci (Paris)* *34*, 72–78.
- Kaufmann, E., and Knöchel, W. (1996). Five years on the wings of fork head. *Mechanisms of Development* *57*, 3–20.
- Levings, M.K., Sangregorio, R., Galbiati, F., Squadrone, S., Malefyt, R. de W., and Roncarolo, M.-G. (2001). IFN- $\alpha$  and IL-10 Induce the Differentiation of Human Type 1 T Regulatory Cells. *The Journal of Immunology* *166*, 5530–5539.
- Lorenz, T.C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *JoVE* 3998.
- Lykken, J.M., Candando, K.M., and Tedder, T.F. (2015). Regulatory B10 cell development and function. *Int Immunol* *27*, 471–477.
- Maeda, Y., Nishikawa, H., Sugiyama, D., Ha, D., Hamaguchi, M., Saito, T., Nishioka, M., Wing, J.B., Adeegbe, D., Katayama, I., et al. (2014). Detection of self-reactive CD8<sup>+</sup> T cells with an anergic phenotype in healthy individuals. *Science* *346*, 1536–1540.
- Mathys, V., Lefèvre, P., Fontaine, V., Dehem, M., Donnio, P.Y., Février, F., Le Coustumier, A., and Bifani, P. (2007). La PCR en temps réel : principe et application en infectiologie. *Antibiotiques* *9*, 205–211.
- Mauri, C., and Bosma, A. (2012). Immune Regulatory Function of B Cells. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 221–241.
- Mauri, C., and Menon, M. (2015). The expanding family of regulatory B cells. *Int Immunol* *27*, 479–486.
- Mercer, F., and Unutmaz, D. (2009). The Biology of FoxP3: A Key Player in Immune Suppression during Infections, Autoimmune Diseases and Cancer. *Adv Exp Med Biol* *665*, 47–59.
- Nie, H., Zheng, Y., Li, R., Guo, T.B., He, D., Fang, L., Liu, X., Xiao, L., Chen, X., Wan, B., et al. (2013). Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF- $\alpha$  in rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* *19*, 322–328.

## Chapitre 6. Bibliographie

---

- Ohue, Y., and Nishikawa, H. (2019). Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? *Cancer Sci* *110*, 2080–2089.
- Pereira, L.M.S., Gomes, S.T.M., Ishak, R., and Vallinoto, A.C.R. (2017). Regulatory T Cell and Forkhead Box Protein 3 as Modulators of Immune Homeostasis. *Front. Immunol.* *8*.
- Piccirillo, C.A., and Shevach, E.M. (2001). Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J. Immunol.* *167*, 1137–1140.
- Polansky, J.K., Kretschmer, K., Freyer, J., Floess, S., Garbe, A., Baron, U., Olek, S., Hamann, A., von Boehmer, H., and Huehn, J. (2008). DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur. J. Immunol.* *38*, 1654–1663.
- Qureshi, O.S., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E.M., Baker, J., Jeffery, L.E., Kaur, S., Briggs, Z., et al. (2011). Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* *332*, 600–603.
- Ray, A., Wang, L., and Dittel, B.N. (2015). IL-10-independent regulatory B-cell subsets and mechanisms of action. *Int. Immunol.* *27*, 531–536.
- Saraiva, M., and O’Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 170–181.
- Simpson, T.R., Li, F., Montalvo-Ortiz, W., Sepulveda, M.A., Bergerhoff, K., Arce, F., Roddie, C., Henry, J.Y., Yagita, H., Wolchok, J.D., et al. (2013). Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J Exp Med* *210*, 1695–1710.
- Siri, A., Boysson, H. de, and Boursier, G. (2012). Actualité sur les lymphocytes T régulateurs CD4+. *Med Sci (Paris)* *28*, 646–651.
- Takeuchi, Y., and Nishikawa, H. (2016). Roles of regulatory T cells in cancer immunity. *Int Immunol* *28*, 401–409.
- Uyttenhove, C., Pilotte, L., Théate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T., and Van den Eynde, B.J. (2003). Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat. Med.* *9*, 1269–1274.
- Wan, Y.Y., and Flavell, R.A. (2007). ‘Yin–Yang’ functions of transforming growth factor- $\beta$  and T regulatory cells in immune regulation. *Immunological Reviews* *220*, 199–213.
- Zhang, Y., Gallastegui, N., and Rosenblatt, J.D. (2015). Regulatory B cells in anti-tumor immunity. *Int Immunol* *27*, 521–530.