



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 Biologie

*Laboratoire de biologie moléculaire et immunologie*



# MEMOIRE

Présenté par

**Mokhfi Salima**

*En vue de l'obtention du*

**Diplôme de MASTER**

En Immunologie

**Intitule :**

**Conception d'amorce pour le gène TLR4 dans les macrophages et l'immunité anti-infectieuse**

Soutenu le 22/09/2020 devant le jury composé de :

**Sous la direction de Docteur SMAHI Mohammed Chams Eddine**

Soutenu le 20-09-2020, devant le jury composé de :

**Président**                      brahami nabila    université de Tlemcen

**Examineur**                      Bemensoursouheila amel    Université de Tlemcen

**Année universitaire 2019/20**

---

---

## Résumé

**Introduction :** l'immunité anti-infectieuse est un système complexe qui participe dans le maintien de l'intégrité en assurant la défense contre les agressions grâce à la détection et la mise en place de mécanismes protecteurs par des acteurs cellulaires tel que les macrophage qui joue un rôle essentiel dans l'initiation d'une réponse innée par la reconnaissance des pathogènes via des récepteurs membranaires de type Toll notamment les TLR4 qui reconnaissent une large variété des ligands microorganismes tel que les LPS des bactéries gram négatif.

**Objectif :** de concevoir une amorce spécifique qui encadrent le gène TLR4 à l'aide de logiciel primer-blast

**Matériel et méthodes :** Les séquences des gènes TLR4 ont été obtenues grâce à la base de données Ensemble.Org le logiciel Primer-Blast a été utilisé pour concevoir des amorces spécifiques pour le produit amplifié

**Résultats :** des amorces aspécifiques ont été obtenus, ce qui nous a obligés à changer la séquence à amplifier. Les amorces obtenues sont spécifiques des transcrits des gènes TLR4 et présentent des caractéristiques optimales pour le bon déroulement d'une PCR.

**Conclusion :** nous avons pu dans cette étude de concevoir des amorces spécifiques encadrant les transcrits de gène TLR4 afin d'évaluer Pour cela il existe plusieurs outils de la bio-informatique qui permettent de retrouver les séquences de référence de n'importe quel gène.

**Mots clés :** immunité anti-infectieuse, Macrophage, TLR4

**Abstract****Introduction:**

anti-infectious immunity is a complex system which participates in the maintenance of integrity by ensuring defense against aggression through the detection and implementation of a protector mechanism by cellular actors such as macrophages which plays an essential role in the initiation of an innate response through the recognition of pathogens via toll-type membrane receptors , notably TLR4 which recognize a wide variety of microorganisms such as the LPS of gram-negative bacteria.

**Objective:** to design a specific prime that frame the TLR4 gene using primer-blast software.

**Materiel and method:** TLR4 gene sequences were obtained using the Ensemble.Org database. And the primer –blast software was used to design specific primers for the amplified Product.

**Result:** a specific primers were obtained, which forced us to change the sequence to be amplified, the primers obtained are specific for TLR4 genes transcripts and have optimal characteristics for the proper conduct of a PCR.

**Conclusion:** IN this study we were able to design specific primers framing the TLR4gene transcripts in order to evaluate the effects of the PCR on the product. For this purpose there are several bio-computing tools that allow us to find the reference sequences of any gene.

**Keyword:** Anti-infectious immunity– macrophage- TLR4

## المخلص

## مقدمة

الحصانة المضادة للعدوى هي نظام معقد يساهم في الحفاظ على السلامة من خلال ضمان الدفاع ضد الهجمات بفضل اكتشاف وانشاء اليات وقائية من قبل الجهات الخلوية البلاعم التي تلعب دورا أساسيا في بدء استجابة مناعية من خلال التعرف على مسببات الامراض عن طريق مستقبلات غشائية لاسيما TLR4 والتي تتعرف بمجموعة متنوعة من الكائنات الحية الدقيقة المتواجدة على سطح البكتيريا من نوع LPS

**الهدف:** للحصول على بريمر محدد الذي يحيط بجين TLR4 باستخدام برنامج الانفجار التمهيدي

**الوسائل والطرق:** تم الحصول على تسلسل جينات TLR4 بفضل قاعدة بيانات Ensembl.Org وباستخدام برنامج Primer-Blast لتصميم بادئات محددة للمنتج المضخم.

**النتائج:** تم الحصول على بادئات غير محددة مما اجرنا على تغيير تسلسل المراد تضخيمه البادئات التي تم الحصول عليها خاصة بنسخ tlr4 ولها خصائص مثالية للتشغيل السليم للPCR

**الخلاصة:** في هذه الدراسة تمكنا من تصميم بادئات محددة توظف النصوص الجينية TLR4 من اجل التقييم لهذا هناك العديد من ادوات المعلوماتية الحيوية التي تجعل من الممكن العثور على التسلسلات المرجعية لأي مورثة.

**كلمات الاساسية:** البلاعم -TLR4- الاستجابة المضادة للعدوى

**REMERCIEMENT**

Au nom de Dieu qui a repéré les cieux et la terre, au nom de Dieu, l'amour et l'intention de Dieu, nous louons notre seigneur pour toutes les bénédictions qu'Il nous a accordées d'un esprit réfléchi et d'une langue parlante pour exprimer tout ce que nous recherchons et existons dans notre esprit.

*« Chaque pas est une victoire » Lao-Tseu*

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** qui a tout mis pour que les entraves disparaissent devant notre chemin, je vous adresse mes plus sincères remerciements, que ce travail soit le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect

En premier lieu, je tiens à remercier mon encadreur monsieur **SMAHI Mohammed Chams Eddine** pour sa disponibilité malgré ses nombreuses charges, ses conseils scientifique judicieux et son bon sens de gouvernance afin que nous réalisons ce projet.

Je tiens aussi à adresser toute ma gratitude au **Docteur Wafa Nouari** pour son soutien, son dynamisme, et ses précieux conseils.

Je tiens à remercier les membres de jury, d'avoir accepté de juger ce travail, malgré leurs obligations professionnelles

Je ne saurais terminer sans remercier l'ensemble des enseignantes à qui revient le mérite de notre formation et à tous ceux et celles, qui sont dans l'ombre et qui ont permis par leurs conseils et leur compétence la réalisation de ce mémoire.

Ainsi que ma famille qui m'a beaucoup soutenue

Mes remerciements vont également à toutes mes amies et camarades de promotion pour ces deux années passées ensemble dans les meilleurs moments

A toutes les personnes qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail

C'est au terme d'un voyage de 5 ans que je souhaite remercier toute les personnes qui ont partagé avec moi cette aventure

## Dédicace

---

---

### *Dédicace*

#### ***Je dédie ce mémoire spécialement :***

*A ma chère mère la lumière de ma vie et ma raison d'être qui a sacrifié sa vie pour ma réussite et éclairé mon chemin, pour son amour, son soutien moral. J'espère que Dieu lui prête bonheur et longue vie.*

*A mon père qui m'a toujours encouragé à aller si loin dans mes études, ma source inépuisable de motivation, j'espère que tu es fier de moi*

*A mes adorables sœurs, Amel, Raounek, Samah, Souhila et Salsabil que je leur souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que dieu, le tout puissant, les protège et les garde*

*A toutes mes familles, **Mokhfi** pour avoir partagé cette immense joie avec moi et d'être présent à toutes les occasions*

*Mes chères amis et je regrette de ne pas pouvoir citer tous leur nom de m'avoir supporté et de leur soutien morale inlassable, sans oublier tous les personnes que j'estime.*

***Merci infiniment !!!***

***« Le bonheur est parfois caché dans l'inconnu »Victor- Hugo***

## Table de matière

Résumé	iii
Abstract	iv
Résumé en Arabe	v
Liste des figures	vii
Liste de tableaux	ix
Liste des abréviations	x
Introduction	1
Chapitre 1. Revue de littérature .....	2
1 Immunité anti-infectieuse.....	2
1.1 Définition .....	Erreur ! Signet non défini.2
1.1.1 Immunité innée.....	Erreur ! Signet non défini.2
1.1.2 Immunité adaptative.....	Erreur ! Signet non défini.2
1.1.3 Immunité et infection .....	3
1.2 Macrophage.....	4
1.2.1 Définition .....	4
1.2.2 Origine des macrophages .....	5
1.2.3 Sous population des macrophages .....	6
1.2.4 Polarisation des macrophages.....	7
1.2.5 Rôle des macrophages .....	8
1.2.6 Macrophages dans les infections .....	9
1.3 TLR.....	Erreur ! Signet non défini.10
1.3.1 Localisation .....	Erreur ! Signet non défini.11
1.3.2 Structure de TLR .....	13
1.3.3 TLR <sub>4</sub> .....	14
1.3.4 TLR4 récepteur au LPS.....	15
1.3.5 TLR4 et Macrophage .....	15
1.3.6 Signalisation.....	17
1.4 PCR .....	19
1.4.1 Définitions .....	19
1.4.2 Principe.....	19
1.4.3 Les constituants.....	20
1.4.4 Technique .....	20
1.4.5 La Taq pol .....	22
1.5 Amorces.....	22
1.5.1 Définition .....	22
1.5.2 Conception d'amorce par PCR.....	22
Chapitre 2. partie expérimentale.....	21

---

---

<b>2</b>	<b>Gène TLR4 .....</b>	<b>24</b>
2.1	Recherche de la séquence de référence du gène TLR4 .....	25
2.2	Séquence du gène TLR4 : .....	26
2.3	Le désigne de primer .....	26
<b>3</b>	<b>Analyse des Résultats du Primer Blast : .....</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>Les amorces encadrent le transcrit de gene TLR4 : .....</b>	<b>33</b>
	<b>Chapitre3.Résultats.....</b>	<b>34</b>
	<b>Chapitre5.conclusion et perspectives.....</b>	<b>35</b>
	<b>Références et bibliographiques.....</b>	<b>36</b>

---

---

**Liste des figures**

**Figure 1.1** : origine et différenciation à partir des monocytes

**Figure 1.2** : localisation anatomique des sous –population tissulaire de macrophage

**Figure 1.3** : sous population de macrophage et leurs marqueurs

**Figure 1.4** : les étapes clé du phagocyte

**Figure 1.5** : macrophage répond à l'infection par sécrétion des cytokines inflammatoire

**Figure 1.6** : le processus inflammatoire du macrophage dans l'infection

**Figure 1.7** : localisation et ligands des TLRs

**Figure 1.8** : structure de TLR

**Figure 1.9** : la fixation des LPS par TLR4 dans les macrophages induit l'activation NFkB et la synthèse des cytokines inflammatoire.

**Figure 1.10** : signalisation de TLR4

**Figure 1.11** : voie de signalisation dépendent de MyD88

**Figure 1.12** : voie de signalisation indépendante de MyD88

**Figure 1.13** : élément de base d'amplification d'un produit

**Figure 1.14** : les étapes cruciales d'amplification d'un produit

**Figure 1.15** : étape d'élongations

**Figure 1.16** : polymérisation à l'aide de taq polymérase

**Figure 2.1**: Plateforme de la base de données Ensembl.

**Figure 2.2** : Introduction du gène TLR4 dans la base de données ENSEMBL

**Figure 2.3** : code donnée pour le gène TLR4

**Figure 2.4.** La séquence du transcrit de TLR4 est ensuite copiée dans un document Word afin de faciliter son utilisation

**Figure 2.5** : Plateforme de la banque de donnée du NCBI

**Figure 2.6** : interface de logiciel primer-blast

**Figure 2.7** : séquence du gène TLR4 prise depuis la base de données Exemple

**Figure 2.8** : copier la séquence de produit amplifié dans la base de données

**Figure 2.9** : statistique d'une séquence de produit amplifie

**Figure 2.10** : représentation graphique de 10 paires d'amorces encadrent le transcrit de gène TLR4

**Figure 2.11** : les paires d'amorces obtenue avec l'outil primer- blast, encadrent une partie du transcrit du gène TLR4.

**Figure 2.12** : Analyse de la séquence d'intérêt par le primer Blast.

**Figure 2.13** : Résultat de primer.

**Figure 2.14** : confirmation des résultats par le site UCSC in silico PCR

Liste des tableaux

**Tableau 1.1 :** les pathogène exploitent divers compartiment du corps qui sont protégé de manière diffèrent

**Tableau 1.2 :** agoniste des TLRs

**Liste des abréviations****A**

Arg: arginine

**C**

CFU: cloning forming unit of myeloid and lymphoid cell

CFU-GM: granulocyte macrophage colony stimulating factor

CRP : C-réactive protéine

**D**

DNTPs : DésoxyNucléotides-Tri-Phosphates

**I**

IFN : interféron

IL : interleukine

IRAK : interleukine1 associe aux kinases

ILC : cellule lymphoïdes innées

**L**

LPS : lipopolysaccharide

LRR : leucine Riche récepteur

**M**

MA : macrophage alvéolaire

M<sub>1</sub> : macrophage classique

M<sub>2</sub> : macrophage alternative

MMP : métallo protéase matricielles

MyD88 : gène de réponse primaire de différenciation myéloïde 88

**N**

NO : monoxyde d'azote

NOS : monoxyde d'azote synthase

NLR : récepteur de type NOD

NF-κB: facteur nucléaire κB

**P**

PRR : récepteur de reconnaissance de motif moléculaire

PNN : polynucléaires neutrophiles

PAMP : motif moléculaire associé aux pathogènes

PCR : polymérase Chain réaction

**T**

TNF : facteur de nécrose tumorale

TLR : récepteur de type Toll

TGF : facteur de croissance transformant

Th : T helper

TIR : récepteur Toll-interleukin-1

TRIF : adaptateur contenant un domaine TIR induisant un IFN  $\beta$

TRAF6 : facteur 6 associé au récepteur du TNF

TRAM : molécule adaptatrice liée au TRIF

TF : température de fusion

**R**

ROS : récepteur tyrosine kinases.

## Introduction

---

---

### Introduction

L'hôte exposée a différents agents pathogènes plus de 750.000 cas chaque année correspondant à 2-11% de l'ensemble des hospitalisations répond avec des outils transcriptionnels communs appelé : réponse à l'infection agissent par les deux mécanismes qui sont l'immunité innée et adaptative, la réponse anti-infectieuse dépend de la nature de pathogène (virus, bactérie, champignons, parasite) , les macrophages inducteurs d'inflammation sont les premiers acteurs essentiels de la défense anti-infectieuse par la reconnaissance d'une grande majorité des motifs antigéniques très conservés via les récepteurs de surface PRR de type Toll notamment les TLR4.

TLR4 est un récepteur membranaire impliqué dans la réponse inflammatoire qui reconnaît et est activé par le lipopolysaccharide bactérien (LPS), qui est le principal composant moléculaire de la paroi cellulaire des bactéries à Gram-négatif.

Plusieurs études ont signalé que les analyses PCR jouent un rôle crucial dans l'association génétique à la maladie infectieuse

L'interaction pathogène réceptrice de surface des macrophages induit l'activation d'une voie de signalisation qui permet la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires pour la guérison d'infection.

Dans cette optique nous avons essayé de montrer l'association de gène TLR4 à l'immunité anti-infectieuse pour ce faire nous sommes basés sur la conception des amorces spécifiques encadrant une partie du transcrit du gène TLR4 grâce au logiciel en ligne primer-blast

### 1. Immunité anti-infectieuse

#### 1.1 Définition

L'ensemble des différents types de cellules et des multitudes molécules qui forment un système complexe participe dans le maintien d'intégrité en assurent les défenses d'organisme contre les agents pathogènes telles que : les virus, les bactéries, les parasites ou contre certaines molécules étranger toxique, il est aussi capable de détruire les cellules transformées ou modifie. Il s'agit donc d'un système de surveillance, d'identification et d'élimination des microorganismes et de reconnaissance des motifs antigénique.

La défense anti infectieuse de l'organisme fait appel à la fois à l'immunité innée et l'immunité adaptative. (Peter, 2015)

##### 1.1.1 Immunité innée

Réponse constitutive non spécifique de l'agent pathogène, premier ligne de défense empêche la plus part des infections de se propage. Ne nécessitent pas de réarrangement des gènes mais constituent des molécules performées. Elle utilise des barrières physique telles que : la peau, les muqueuses, les larmes qui contient des enzymes comme les lysozymes. Elle comporte non seulement des acteurs cellulaire comme les cellules dendritiques, les NK, des cellules dotées de la capacité de phagocytes (les macrophages, les PNN) les cellules lymphoïdes innée (ILC) régulatrice de l'état inflammatoire de l'organisme ainsi des molécules telles que les interférons, les facteurs des compléments, des agents microbiennes synthétises par l'hôte Ces molécules permet au système immunitaire de distinguer le soi de non soi. (John et al. 2017). L'immunité innée est capable de reconnaître groupes des molécules retrouvés sur certaine pathogène via des récepteurs PRR, de recruter les cellules immunitaire effectrice, d'induire une réponse inflammatoire et d'initier une réponse adaptative.

##### 1.1.2 Immunité adaptative

Second voie de réponse permet d'éliminer la majeure partie des agents infectieux ayant échappé à la réponse immunitaire innée, elle nécessite que l'antigène soit traité et reconnu pour engendrer des réponses médiées par les lymphocytes T activée qui se divise en des cellules auxiliaire et cytotoxique et la production relative des cellules th1 et th2 effectrices et de cellules TCD8 dépend de la nature D'infection ,et des cellules B produisent des molécules effectrice y

## Chapitre 1. Revue de la littérature

compris les anticorps spécifique au antigène, protège contre d'une réinfection a courte terme ,confère une immunité a long durée contre le pathogène (Peter,2015)

### 1. Immunité et infection

Il existe quatre types de pathogène de l'homme : virus, bactéries, champignons et parasite .les trois premier correspond à un taxonomique de micro-organismes et dernier désigne des organismes eucaryotes. Dans le contexte de défense de l'hôte on distingue deux types d'infection extracellulaire qui prolifèrent dans l'espèce entre les cellules, les formes extracellulaire des pathogènes sont accessibles aux molécules solubles du système, ces pathogènes s'étendent à d'autres tissus par transport dans la lymphe et le sang. L'autre c'est les infections intracellulaire causées par des pathogènes multiplient dans les cellules humaines et colonisent le noyau ou le cytosol tandis que d'autre pathogènes se multiplient dans les vésicules liées à la membrane et dérivées des endosomes (Peter, 2015) (Tab1.1)

**Tableau 1.1** les pathogènes exploitent divers compartiments du corps qui sont protégés de manières différente

	extracellulaire		Intracellulaire	
	Espace interstitiel, lymphe, sang	Surfaces épithéliales	Cytoplasme	Vésicules
Site infectieux				
pathogène	Virus Bactéries Protozoaires champignons	Streptococcus Pneumonie Escherichia coli Candida albicans	Virus Chlamydia Spp Listeria	Mycobactéries Salmonella Cryptococcus Yersinia pestis pneumophila
Immunité de protection	Anticorps Complément Phagocytose neutralisation	Anticorps, particulièrement IgA Peptide antimicrobiens	Cellules T cytotoxiques Cellules NK	Activation des macrophages dépendant des cellules T et des cellules NK

Presque tous pathogènes passent par un stade extracellulaire au cours de leur cycle de vie. Pour certains, tous les stades se déroulent dans l'espèce extracellulaire tandis que d'autres exploitent les sites intracellulaires pour se reproduire et proliférer. La guérison des infections nécessite l'élimination de l'agent infectieux par une réponse immunitaire de telle nature. Les mécanismes de l'immunité innée entrent en jeu après la pénétration du pathogène à travers la barrière épithéliale dans les tissus ce qui induit l'activation d'un composant sert à détruire les pathogènes invasifs ces derniers sont les cellules phagocytaires deux types cellulaires les neutrophiles et les macrophages possèdent des propriétés distinctes et des fonctions complémentaires (Peter, 2015).

### 1.2 Macrophage

#### 1.2.1 Définition

Les macrophages dont le nom dérive du grec « gros manger » (Makros = grand, phagein = manger) sont des cellules hématopoïétiques très hétérogènes, de durée de vie relativement longue s'adaptant à leur environnement local. Ce nom fut employé à la fin de 19<sup>ème</sup> siècle pour la première fois par Eli Metchnikoff pour décrire la présence des cellules appartenant à la lignée myéloïde capable de phagocyter les pathogènes et assurer la surveillance immunitaire. Les macrophages sont la forme mature des monocytes circulant qui ont quitté le flux sanguin pour résider au sein des tissus où ils subissent une augmentation de la taille et de leur teneur en lysosomes pour devenir des macrophages. Ils sont impliqués dans les réactions inflammatoires et anti-infectieuses ainsi dans le maintien de l'homéostasie tissulaire, ainsi la sécrétion des fractions du complément et des cytokines. (Fang et al. 2017).

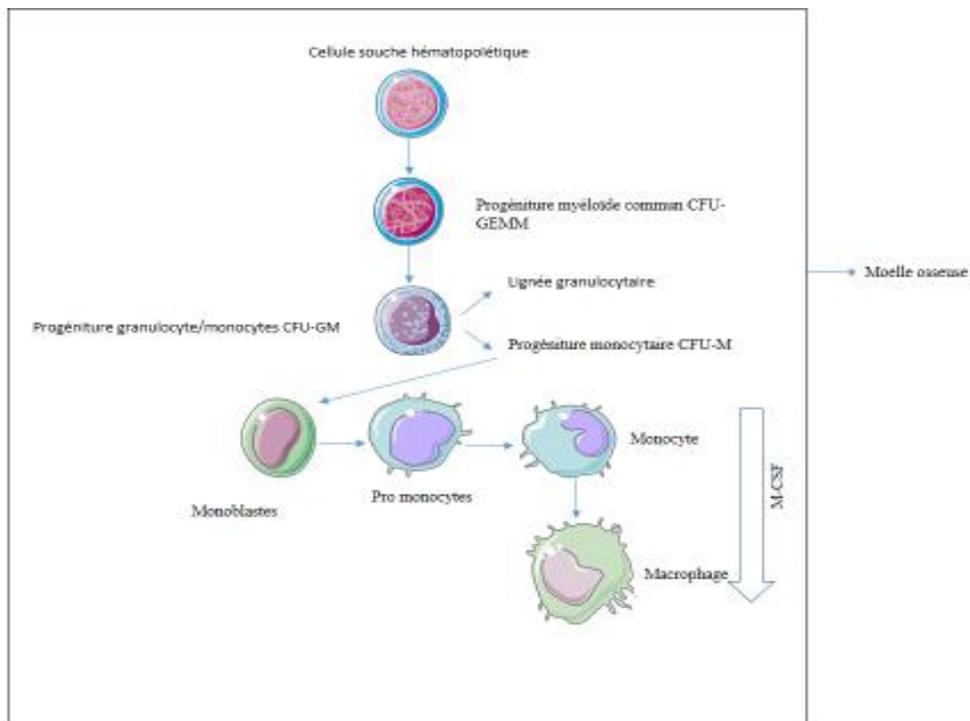
Les macrophages ont un large panel de gènes qui leur confèrent une spécialisation fonctionnelle en fonction de leur localisation dans les différents tissus de l'organisme où ils se différencient après leur rencontre avec un antigène (BERNARD, 2011).

#### 1.2.2. Origine des macrophages

Après coloration supra-vitale, les macrophages sont tirés à partir de monocytes. Les macrophages ont pour origine le CFU-ML (colony forming unit of myeloid and lymphoid cell) qui sous l'influence des cytokines et de facteurs de croissance comme le GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor)

précurseur des granulocytes et des macrophages et sous l'action combinée du facteur de croissance M-CSF /GM-CSF et du CFU-GM (colony forming unit of granulocyte and macrophage cells), se différencie en CFU-M (colony forming unit of macrophage),(Geissmann et al. 2010).

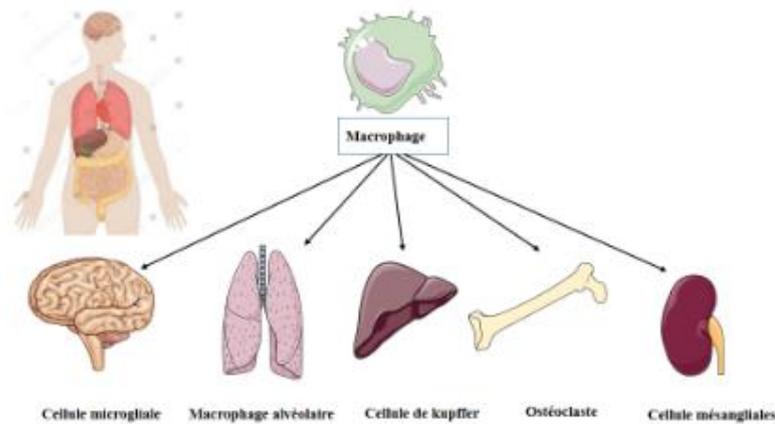
Le processus de différenciation se poursuit avec les monoblastes, qui se différencient en pro-monocytes pour finalement devenir des monocytes. (Stein et al., 1992; Mills et al., 2000; Martinez et al., 2006; Jaguin et al., 2013; Martinez et al., 2013; Gundra et al., 2014; Italiani et al., 2014; Xue et al., 2014) Ces monocytes quittent la moelle pour aller dans la circulation sanguine puis quittent le sang migrer vers les tissus qu'ils se différencient en macrophage (figure.1.1).



**Figure 1.1 :** Origine et différenciation des macrophages à partir des monocytes (Gordon, 2003)

### 1.2.3. Sous population des macrophages

Les Macrophages sont divisés en sous-population en fonction de leur localisation et leur phénotype fonctionnel (Stout et al, 2004) (figure 1.2)



**Figure 1.2 :** Localisation anatomique des sous-populations de macrophage tissulaires (Murray et al, 2011a).

### 1.2.4. Polarisation des macrophages

Deux facteurs modulent l'état de polarisation des macrophages, avec une orientation des macrophages vers le phénotype M1 par le GM-CSF et M2 par le M-CSF (Vogel et al. 2014).

#### 1.2.4.1. Macrophage M1

Ils sont dits classiques, ils interviennent dans les réponses inflammatoires ainsi dans la résistance de l'hôte aux pathogènes intracellulaires. Ils sont activés lorsqu'ils sont stimulés par  $\text{IFN-}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$  ou par des composants tels que LPS. (Cheshire et al, 1997 ; Schroder et al, 2004). Ces macrophages ont une forte capacité à présenter les antigènes, à produire l'IL12 et IL23 et par conséquent à polariser la réponse vers la voie TH1. Ils expriment le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, et produisent le monoxyde d'azote (NO) par activation de l'iNOS (inductible nitrique oxide synthase) (Chávez-Galán et al. 2015 ; Verreck et al. 2004). La polarisation M1 favorise la phagocytose des pathogènes opsonines via les récepteurs pour la partie FC des immunoglobulines (FcR) et les récepteurs pour le complément comme CR3. Ils vont produire de l'IL-1, de l'IL-6 et de l'IL-23. L'IL-23 active les cellules Th17 impliqué dans l'inflammation. Ainsi les chemokines produites sont essentiellement de type CC (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, CCL19, CCL20) mais l'IFN- $\gamma$  augmente également la production de CXCL10 et CXCL13 permettant la mise en place d'une réponse complète de type 1 (Chawla, Nguyen, et Goh 2011).

### 1.2.4.2. Macrophage M2

Dits alternatifs, ils ont une activité modulatrice et interviennent dans les phénomènes de réparation, l'allergie ainsi que dans la résistance contre les parasites. (Fairweather et Cihakova 2009) Ils sont associés à la réponse TH2, (Martinez, Helming, et Gordon 2009). Ces macrophages sont subdivisés en trois classes : i) l'exposition à l'IL-4 ou l'IL-13 induit une polarisation dite M2a intervenant dans les processus de réparation tissulaire, ii) l'induction des ligands des TLR ou du IL-1R aboutit à une polarisation M2b produisant essentiellement CCL1 permettant une réponse immunorégulatrice avec le recrutement de LT régulateurs ; iii) M2c par l'induction de l'IL-10, (Benoit, Desnues, et Mege 2008) TGF $\beta$  ils produisent également des PGE2, ce est qui retrouvé dans la phase de résolution de l'inflammation. Une forte expression d'arginase-1, Ym1 de type chitinase (Chi313), les M2 produient des chimiokines telles que CCL1, CCL13, CCL18, CCL22 et CCL24, et expriment une variété de molécules de surface, telles que les récepteurs du mannose (MRC1/CD206), les récepteurs scavenger B-1, CD163, CCR2, CXCR1et CXCR2. (Fairweather et Cihakova 2009)(figure 1.3).

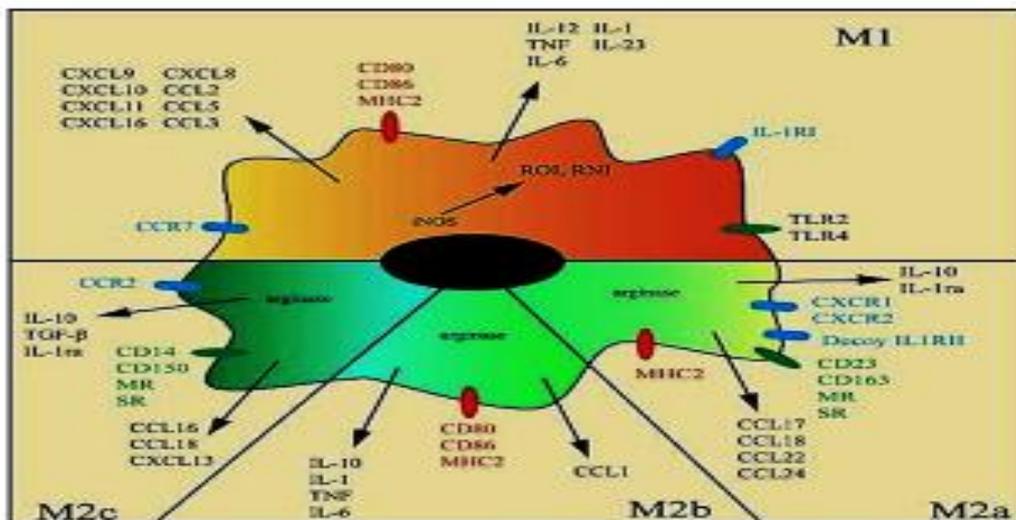


Figure1.3 : Sous populations de macrophages et leurs marqueurs (Benoit et al, 2008).

### 1.2.5. Rôle des macrophages

Les propriétés fondamentales des macrophages sont leur mobilité, leur pouvoir phagocytaire des particules ou bactéries opsonines lie à la présentation antigénique et leur capacité sécrétrices (Green berg, et al.2002) ont un rôle dans le maintien d'homéostasie tissulaire, ainsi sécrétion des fractions du complément, des facteurs hématopoïétique, l'élimination des cellules sénescence et dans remodelage et la réparation des tissus après une blessure ou une infection. (Pipy 2012) Il

possède des récepteurs pour lier les portions FC des immunoglobulines, il produit des agents tels que les NO, des métabolites d'oxygène, des enzymes lysosomales qui permettent de tuer les microorganismes phagocytés.

Ils participent aux défenses immunitaires via la reconnaissance de la grande majorité des pathogènes grâce à la présence des récepteurs à la surface des macrophages. Ces récepteurs peuvent reconnaître des motifs moléculaires associés aux pathogènes, (Taylor et al. 2005) qu'on appelle les récepteurs PRR (Pathogène Reconnaissance Récepteurs). Ces motifs sont composés par exemple des lipopolysaccharides bactériens appelés aussi LPS, de la flagelline, du peptidoglycane, des motifs particuliers d'acides nucléiques. Ces motifs moléculaires sont absents chez l'humain ce qui permet aux macrophages de distinguer les cellules de l'organisme des microorganismes étrangers grâce à ces récepteurs PRR. On regroupe les PRR sous plusieurs familles. (Taylor et al. 2005).

Sont de 3 types suivant leur localisation :

- Les PRR solubles comme la protéine CRP, ou les PRR sécrétés, se situent dans les fluides corporels.

- PRR membranaires :

- a. Les récepteurs au mannose

- b. Les récepteurs scavenger

- PRR endocytiques, se situent à la surface des cellules.

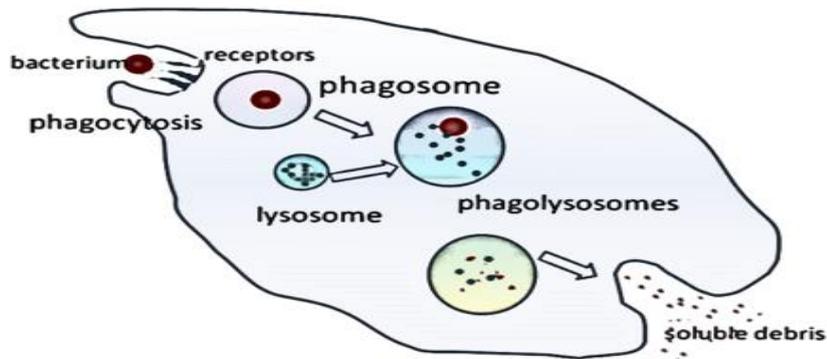
- PRR cytoplasmiques, ou PRR de signalisation tels que les TLR, se situent dans le cytoplasme.

### 1.1.3 Macrophages dans les infections

#### 1.2.6.1. Phagocytoses

Après la reconnaissance d'un motif antigénique PAMP sur la paroi microbienne par les récepteurs de phagocytose PRR présente à la surface, ces récepteurs entraînent la captation et la fixation d'antigène, le processus d'internalisation initié par la formation de pseudopodes qui englobent la particule, en induisant l'ingestion par une vésicule appelée phagosome dans le cytoplasme.

du macrophage ,la fusion de ces vésicule avec des lysosome forme une vésicule acide appelée phagolysosome contenant de petites molécules toxique et d'enzyme hydrolytique qui tuent et digèrent la bactérie (Murray et al., 2011a).(figure 1.4).



**Figure 1.4 :** Les étapes clé de la phagocytose.

### 1.2.6.2. Reconnaissance des molécules étrangères

L'élimination des pathogène s'accompagne par une réaction inflammatoire elle permise par des nombreux récepteur qu'ils soient localises à la surface, dans le cytoplasme ou à la surface de endosome ceux ces sont capable d'interagir avec des structures moléculaire conservées et induire l'activation de voies de signalisation du macrophage conduit à la production de la cytokine et de médiateur nécessaire la réponse inflammatoire (Peter.2015).

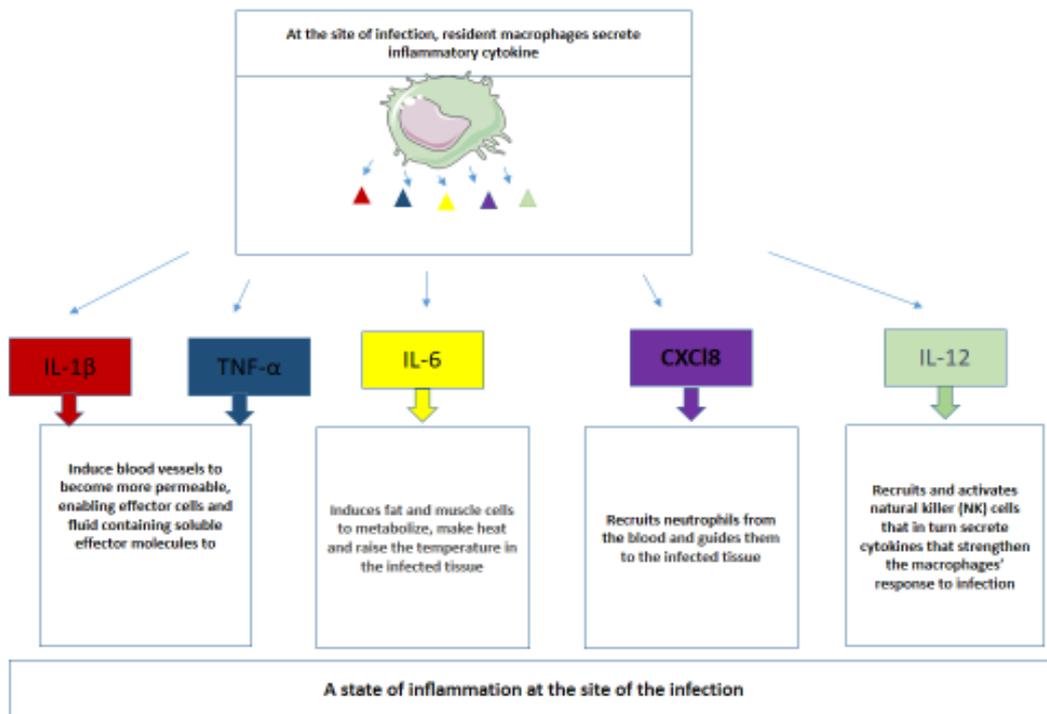
### 1.2.6.3. Inflammations

Les macrophages ont une réponse inflammatoire comprend quatre étapes, la reconnaissance de l'infection par des récepteurs de formes PRR, le recrutement de monocytes et ou in situ prolifération des macrophages dans les tissus infectés locaux, élimination des agents pathogène et conversion en cellules suppressive, donc restauration de l'homéostasie cellulaire. (Chawla, Nguyen, et Goh 2011).

Après l'infection, les macrophages activés à phénotype pro-inflammatoire produisent divers médiateurs pro-inflammatoires, dont le TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 et IFN-I, (Kim et al. 2017) qui participent à l'activation de divers mécanismes microbicides et contribuent à la clairance, ils possèdent plusieurs substances peuvent tuer les bactéries, notamment le ROS, diverses protéines antimicrobiennes comme la défensine ,le NO augmente la sensibilité des macrophages activés par TLR4 à la propagation de Monocytogenes en les favorisant à s'échapper des vacuoles secondaires dans les cellules réceptrices et en retardant la maturation des

## Chapitre 1. Revue de la littérature

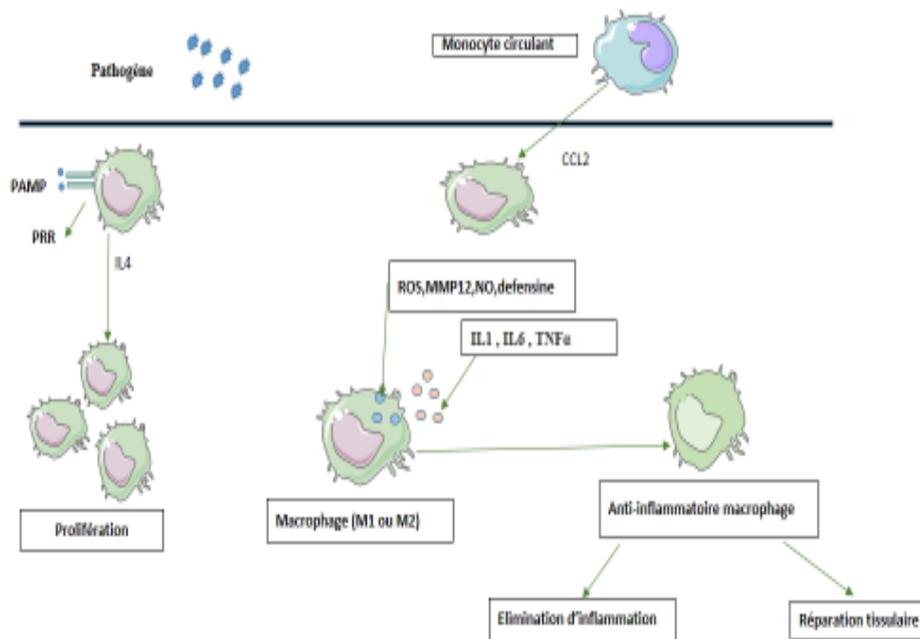
phagosome, l'élastase des macrophage connue sous le nom de MMP12 tue à la fois les bactérie gram-négatives et gram-positive dans les macrophage (Pipy 2012) la MMP12 intracellulaire est mobilisée vers les phagolysosomes des macrophages après ingestion de bactéries puis adhère aux parois cellulaire bactériennes qui perturbent les membranes et entraînent la mort bactérienne .les macrophages peuvent également Médie la réponse immunitaire adaptative suivante contre une infection sévère en produisant IL-12 et IL-23 pour favoriser la polarisation des cellules Th1 et Th17 respectivement, ou en produisant IL-4 et IL -13 pour soutenir la différenciation des cellules Th2 avec l'infection de micro-organismes extracellulaires.la destruction des pathogènes: elle se fait par Des réactions en chaine à l'intérieure du phagolysome grâce à des enzymes : la NADPHoxydase et myéloperoxyase la dégradation de l'agent pathogène abouti à la production de dérivés réactifs del'oxygène : peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , anion super oxyde  $O_2^-$ , acide hypochloreux.la destruction de la paroi du pathogène par des peptides antimicrobiens (defensines), des enzymes protéolytique (lysozyme,elastase,etc...). (Zhang et Wang 2014)(Figure 1.5).



**Figure 1.5 :** Macrophages répond à l'infection par sécrétion des cytokines inflammatoire (Peter, 2015).

#### 1.2.6.4. Activité anti-inflammatoire et réparation tissulaire des macrophages

Après infection une fois que les agents pathogènes envahisseurs ont été complètement effacés, la réponse inflammatoire anti-infectieuse doit être arrêtée et les tissus endommagés doivent être réparés, et les macrophages participent également aux processus les macrophages pro-inflammatoires M1 peuvent eux-mêmes se transformer en macrophages anti-inflammatoire M2, avec une activité anti-inflammatoire puissante et des rôles importants dans la guérison des tissus. L'arginase 1 dérivée des macrophages M2 protège les hôtes contre les lésions tissulaires. Les macrophages M2 jouent non seulement un rôle anti-inflammatoire pendant et / ou après l'infection, mais contribuent également à la réparation des tissus après l'infection, une caractéristique pathologique de la plupart des maladies inflammatoires chroniques qui finissent par entraîner un dysfonctionnement des organes et la mort. De plus, l'absorption des neutrophiles apoptotiques par les macrophages après l'infection reprogramme les macrophages vers un phénotype de résolution M2, qui est un événement clé pour restaurer l'homéostasie tissulaire (David Dong et al., 2009; Murray et al., 2011a) (figure 1.6).



**Figure 1.6 :** le processus inflammatoire des macrophages dans l'infection. Après que des agents pathogène étrangers ont envahi l'hôte, le processus inflammatoire des macrophages a quatre étapes ordonnées et interdépendantes.

### 1.3. TLR

Il a fallu attendre la fin des années 1990 pour que soit identifié une famille de récepteurs membranaires capable d'induire une cascade de signalisation intracellulaire en réponse à la détection du micro-organisme. Ce sont des récepteurs de type péage impliqués dans l'immunité immédiate (Jakka et al. 2018). Découverts chez la drosophile, ces récepteurs peuvent reconnaître des motifs moléculaires conservés associés aux pathogènes qu'on a appelé PAMP (Pathogène Associated Moléculaire Patterns) (Mogensen, 2009). Leur partie extracellulaire contient des domaines répétés riches en leucine appelés LRR (Leucine-Rich Repeat) Ces domaines sont directement impliqués dans la reconnaissance des pathogènes.

De légères variations entre les domaines LRR des différents TLRs permettent de discriminer entre différents pathogènes. Le répertoire toll est variable selon les cellules engagées dans la réponse immunitaire : les TLR 1 et TLR 6 exprimées dans tous les types cellulaires, TLR2-4-8 dans les monocytes, TLR 9-10 dans les cellules B, et TLR3 sélectivement par les cellules dendritiques. Le TLR2 est celui qui reconnaît le plus grand nombre de molécules associées aux pathogènes (Cook, Pisetsky, et Schwartz 2004), TLR4 reconnaît les LPS, TLR3 a pour ligand l'ARN double brin, TLR5 a pour ligand la flagelline des bactéries gram+, et TLR9 reconnaît des structures présentes dans l'ADN des myocytes. Les TLRs font partie de la superfamille TIR (Toll/IL-1Receptor). Ils ont un domaine intracellulaire TIR, et tout comme le récepteur de l'IL-1 déclenchent des voies de signalisation intracellulaire induisant l'activation des facteurs de transcription tels que NF- $\kappa$ B, AP-1 et les facteurs de régulation de l'interféron IRF. (West et al. 2008b).

### 1.3.1 Localisation

Les TLR sont exprimés sur des cellules immunitaires comme les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes B et T, les neutrophiles, les cellules tueuses naturelles (NK), les monocytes, les éosinophiles et sur des cellules non immunitaires comme les fibroblastes, les kératinocytes, les cellules épithéliales des tractus intestinal, respiratoire et urogénital (Polycarpou et al. 2016) Les TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10, identifiés chez la souris et l'homme, sont exprimés sur la membrane plasmique cellulaire d'autre que les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont exprimés sur la membrane de l'endosome chez la souris et l'homme, par contre, TLR11, TLR12 et TLR13 sont des récepteurs endosomaux spécifiques de la souris. (West et al. 2008a) chaque récepteur a un agoniste

## Chapitre 1. Revue de la littérature

microbien spécifique qui entre en interaction avec lui pour l'induction d'une réponse cellulaire. (tableau 1.2).

**Tableau 02** : agonistes des TLRs (Bauer et al, J. Allergy Clin. Immunol., 2012)

Familles de TLR	Agonistes microbiens
TLR1	Triacyl lipopeptide
TLR2	Lipoprotéine Peptidoglycane Lipoarabinomannane
TLR4	Lipopolysaccharide(Lps)
TLR5	Flagelline
TLR6	Diacyl lipopeptide
TLR11	Protéine de bactérie uropathogènes Protéine profiline
TLR3	ARN double brin (virus)
TLR7 et TLR8	ARN simple brin (virus)
TLR9	ADN hypométhylé(=motif CpG)bactérie

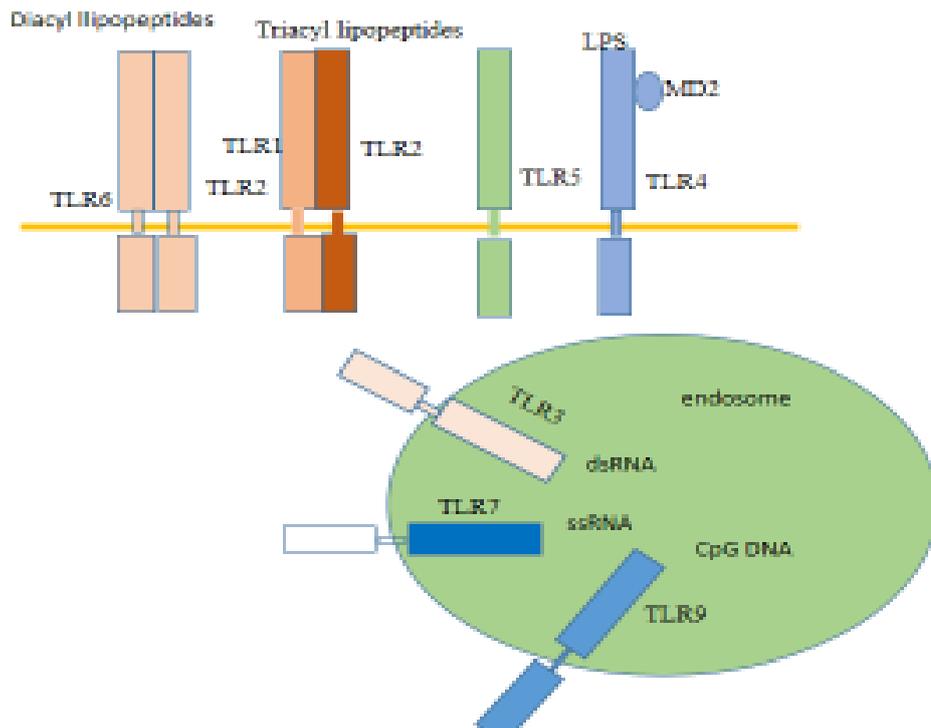
 Récepteur membranaire  
 Récepteur endosomal

### 1.3.2 Structure de TLR

Glycoprotéines transmembranaires composées de trois domaines :

- ✓ Domaine extra membranaire avec des répétitions riches en leucines (LRR).
- ✓ D'un domaine transmembranaire.
- ✓ D'un domaine cytoplasmique comprenant une séquence Toll/IL-1 receptor (TIR)

TLR forment des homodimères après l'interaction avec leurs ligands, d'autres comme TLR2, TLR1, TLR6 et TLR10, s'associent en hétérodimères pour leur activation (TLR2/TLR1, TLR2/TLR6 et TLR2/TLR10). La dimérisation des TLR peut être de deux types. Pour les hétérodimères de TLR2, ainsi que TLR5 et TLR3, la fixation du ligand nécessite le recrutement physique du second TLR pour permettre l'activité biologique. Pour d'autres récepteurs (TLR7, TLR8 et TLR9), le dimère est préformé au cours de la synthèse des TLR, et la détection du ligand permet un réarrangement conformationnel qui active le complexe ce qui permet le rapprochement des domaines TIR puis l'induction d'une signalisation. (Figure 1.7).



**Figure 1.7** : Localisation et ligands des TLRs (Bauer et al, J. Allergy Clin. Immunol., 2012).

### 1.3.3 TLR<sub>4</sub>

Nommé CD284 est un récepteur membranaire a été le premier TLR à être identifié comme orthologue de drosophila Toll membre de la famille TLR son poids moléculaire est de 95kDA et son gène est le TLR4 situé sur le chromosome 9 humaine. Le TLR4 fut d'abord décrit comme le récepteur essentiel du développement dorso-ventral de l'embryon avant d'être identifié comme inducteur de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire qui reconnaît et est activé par le lipopolysaccharide bactérien (LPS), (Rogero et Calder 2018) qui est le principal composant moléculaire de la paroi cellulaire des bactéries à Gram-négatif (Ulevitch et Tobias 1999) aussi impliqué dans la reconnaissance des molécules endogènes libérées par des émissions et des cellules nécrotique blessées. (Mobarak et al. 2018) Le récepteur de type péage 4 (TLR4) exprimé sur les cellules dérivées de myéloïdes, y compris les macrophages et les cellules dendritique, et sur certaines cellules épithéliales et endothéliales et est une composante essentielle de la réponse immunitaire innée. (Van der Mark, et al. 2017). (figure 1.8).

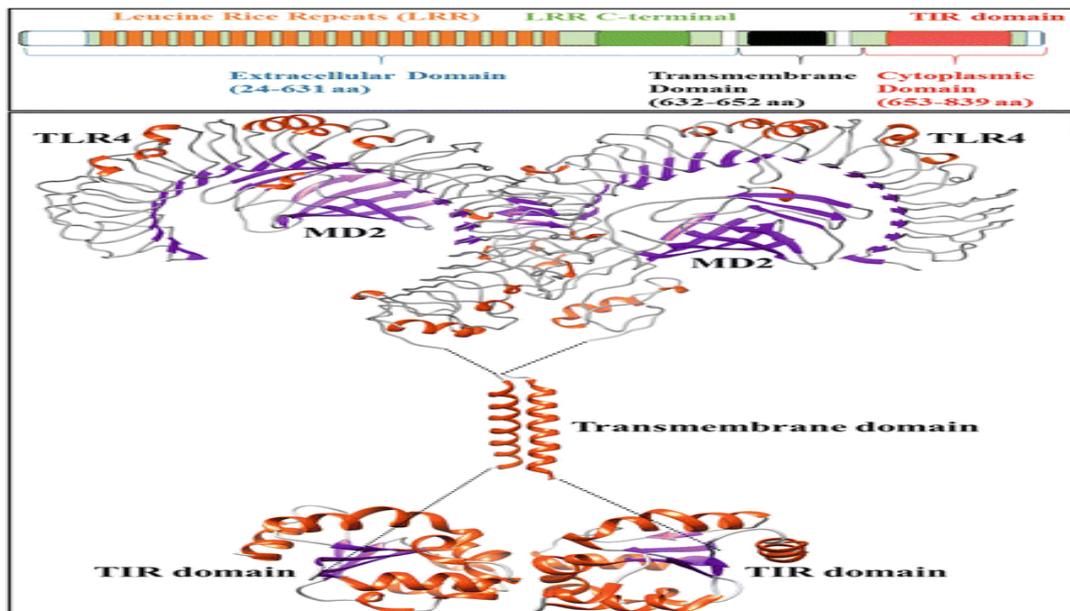


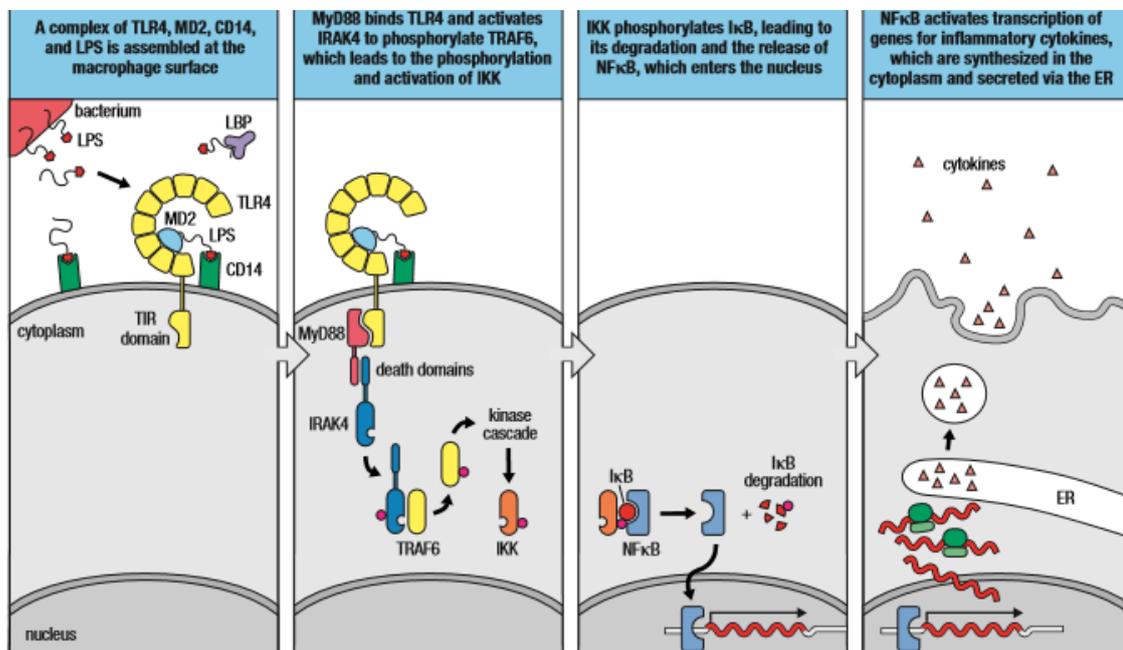
Figure1.8 : structure de tlr4(Carpenter et O'Neill 2009 ).

### 1.3.4 TLR4 récepteur au LPS

l'immunostimulation par les LPS ou endotoxine pro-inflammatoire, est une protéine constitutive de la paroi des bactéries Gram-négatif (qui est connue pour jouer un rôle prépondérant dans l'apparition et le développement d'un état de choc endotoxine lors d'infections à ces bactéries. la liaison du LPS/TLR<sub>4</sub> est assisté LBP (LPS binding protéine) Agit comme transporteur en se liant au lipide A du LPS(Schoeniger, Fuhrmann, et Schumann 2016) Et par leur corécepteur CD<sub>14</sub> qui contient des domaines LRR tout comme celle des TLR et ancre à la membrane par une queue GPI ne permet pas de transmettre un signal intracellulaire. Alors Le complexe LBP-LPS s'associe CD<sub>14</sub> ce qui forme un complexe stable. (Latz et al. 2002) Le CD14 transmet alors le LBP-LPS au TLR4, le TLR4 associé à la protéine MD2 qui interagit avec TLR4 via son domaine LRR .le complexe TLR4-MD2 permet de lier LPS et le rapprochement et la liaison de deux chaîne de TLR4(dimérisation) dont le domaine intra- cytoplasmique réagissent donc la transmission de signal a la cellule et l'initiation d'une cascade de signaux déclenchent le processus inflammatoire ,Les LPS stimule les macrophages pour produire des médiateurs cytotoxique et pro-inflammatoires tels que l'oxyde nitrique, le TNF $\alpha$  ,les lipides bioactifs et les cytokines .les LPS active les récepteurs des macrophages ,ce signal est propagé à traverse la membrane à traverse le cytoplasme et finalement au noyau ou la transcription des gènes des médiateurs pro-inflammatoire . (Guijarro-Muñoz et al. 2014).

### 1.3.5 TLR4 et Macrophage

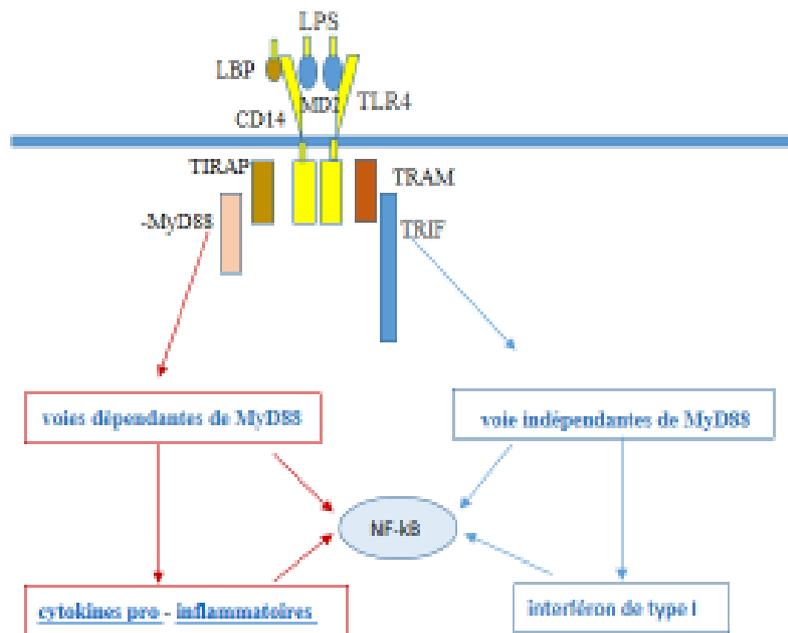
Étant donné le rôle du TLR4 dans l'activation de la réponse pro-inflammatoire pendant l'infection (Blasi et al. 2005), les macrophages peuvent détecter des signaux de danger via le TLR4 ces signaux comprennent les modèles associés aux pathogènes et les modèles associés au dommage, après la reconnaissance des micro-organismes par ces récepteurs, les macrophages répondent par voies transcriptionnelles des gènes responsables de la production de cytokines inflammatoires. Les TLR4 reconnaissent les lipopolysaccharides bactériens, un composant externe des bactéries gram-négatives (Mantovani et al., 2004; Benoit et al., 2008; Martinez et al., 2008; Mosser et al., 2008). Les macrophages se lient aux bactéries avec leur récepteur de phagocytes. Lorsque le LPS est libéré des surfaces bactériennes, il est lié par une protéine à la surface des macrophages appelée CD14 qui agit comme un corécepteur du TLR4. Le LPS peut être capté par une protéine de liaison au LPS soluble dans le plasma et délivré au CD14 à la surface du macrophage. Le dimère TLR4 s'associe à une protéine appelée MD2 et ensemble elle forme un complexe avec CD14 et LPS (Peter, 2015) ce qui induit l'induction du facteur NF- $\kappa$ B, qui répond en sécrétant des cytokines inflammatoires telles que les interférons, l'oxyde nitrique ainsi que le facteur de nécrose tumorale (figure 1.9).



**Figure 1.9 :** la fixation des LPS par TLR4 dans les macrophages induit l'activation de NF $\kappa$ B et la synthèse des cytokines inflammatoires. (Peter. 2015)

### 1.3.6 Signalisation

TLR4 présent à la surface des cellules hématopoïétique et non hématopoïétique compose d'un domaine extracellulaire de 608 résidu et d'un domaine intracellulaire de 187 résidus, l'association d'un TLR4 avec un MD2 est nécessaire pour l'activation induit par le ligand .MD2 s'associe de manière non covalente avec le domaine extracellulaire de TLR4 par interaction avec LPS forment un complexe TLR4/MD2 cette complexe est assiste par une molécule accessoire LBP qui permet le transfert des monomères LPS en interaction avec CD14 vers TLR4/MD2(Guijarro-Muñoz et al. 2014).après la liaison du LPS ,une démerisation de complexe puis un changement des conformation de TLR4 ce qui permet le recrutement de protéine adaptatrice contient des domaine TIR ,une biais d'interaction homophiles entre le domaine TIR dans la queue cytoplasmique de TLR4, quatre protéine adaptatrice implique dans deux voie de signalisation (Tugal et al., 2013)(figure 1.10).



**Figure 1.10** : La signalisation LPS / TLR4 peut être séparée en voies dépendantes de MyD88 et indépendantes de MyD88, qui médient l'activation des cytokines pro - inflammatoires et des gènes d' interféron de type I.

#### 1.3.6.1 Voie MyD88 dépendante

Réglée par deux protéines associées à l'adaptateur : le gène de réponse primaire de différenciation MyD88 et la protéine adaptatrice contenant le domaine

TIR(TIRAP).TIRAP-MyD88 régule l'activation précoce de NF- $\kappa$ B et la production de cytokine pro-inflammatoire(Kuzmich et al. 2017) ,telles que l'IL12 .la signalisation MyD88 implique l'activation de kinases associées au récepteur de l'IL1(IRAK) et du facteur 6 associé au récepteur de TNF (TRAF6) induit l'activation de TAK1 qui conduit à l'activation de cascades MAPK et de IKK (kinase I $\kappa$ B).la voie de signalisation d'IKK conduit à l'induction du facteur transcription NF- $\kappa$ B ,tandis que l'activation d'un autre facteur AP-1.les deux jouent un role dans l'expression des cytokines pro-inflammatoire .l'activation de NF- $\kappa$ B par TAK-1 et commence par l'assemblage d'un complexe protéique appelé signalosome ,constitue d'une protéine d'échafaudage appelé IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  .l'ajout d'une protéine régulatrice au signalosome appelée ubiquitine ,qui déclenche la libération de la protéine NF- $\kappa$ B qui coordonne la translocation dans le noyau des cytokines pro-inflammatoire. (Aerbajinai, al.2013a)(Figure 1.11).

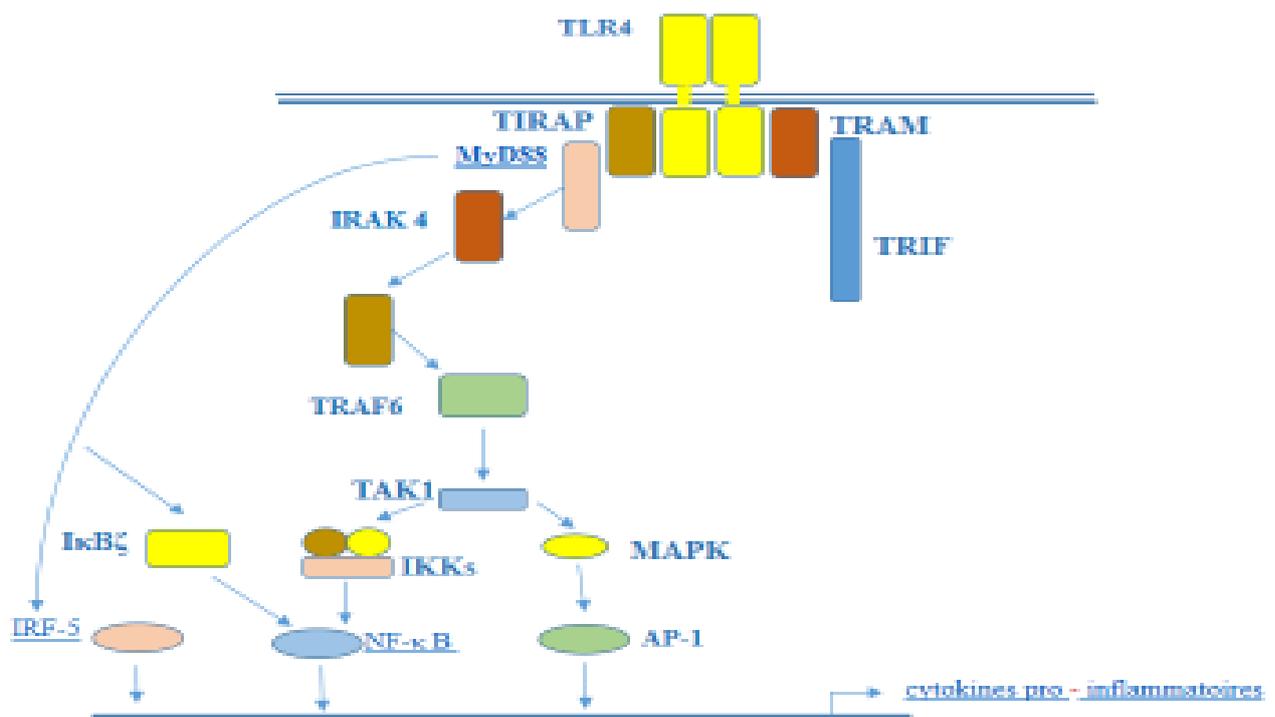


Figure 1.11 : La voie dépendante de MyD88. **MyD88** active les IRAK / TRAF6 ainsi que les facteurs de transcription **NF- $\kappa$ B**, AP-1 et **IRF-5** plus en aval. Ces facteurs de transcription induisent l'expression de gènes de **cytokines pro - inflammatoires**.

### 1.3.6.2 Voie MyD88 indépendante

Des études utilisant des macrophages déficients en TRIF démontrent que le TRIF joue un rôle clé dans l'activation du facteur de transcription IRF3 et dans l'activation en phase tardive de NF- $\kappa$ B et MAPK



## Chapitre 1. Revue de la littérature

---

---

une répétition de cycle de transition de température, chaque cycle contient trois étapes.

### 1.1.5 Les constituants

- ADN Matrice : séquence d'ADN à amplifier.
- Des amorces : de 15 à 30 nucléotide de long.
- Une ADN pol : taq poly extrait de la bactérie thermus aquaticus.
- Les nucléotides dNTPs (Désoxy Nucléotides-Tri-Phosphates) : dATP, dCTP, dGTP, dTTP.

Qui sont les éléments de base utilisés par la Taq Pol pour synthétiser les brins d'ADN complémentaires.(figure 1.13).

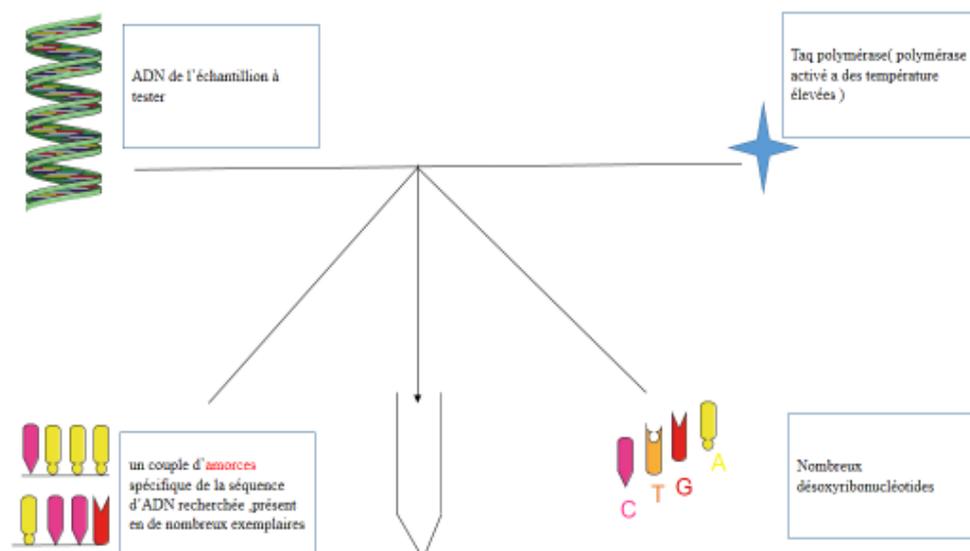


Figure 1.13 : éléments de base utilisés pour amplification d'un produit.

### 1.1.6 Technique

Cette technique impose de connaître la séquence des régions qui délimitent le segment d'ADN à amplifier ==> synthèse de l'oligo-nucléotide complémentaire qui auront 2 fonctions (Water, 2014)(figure 1.14) :

- Permettent de repérer la partie d'ADN à amplifier.

## Chapitre 1. Revue de la littérature

- Serviront d'amorce à l'ADN pol Des cycles successifs sont entrepris  
Chaque cycle comprenant :

**La dénaturation :** (92° à 95°C) : séparation des deux brins de l'ADN qui peuvent être copié par l'ADN pol.

**L'hybridation :** des amorces= amorçage (50 à 55°C) : l'une des amorces se fixe sur un brin d'ADN et la 2ème sur l'autre.

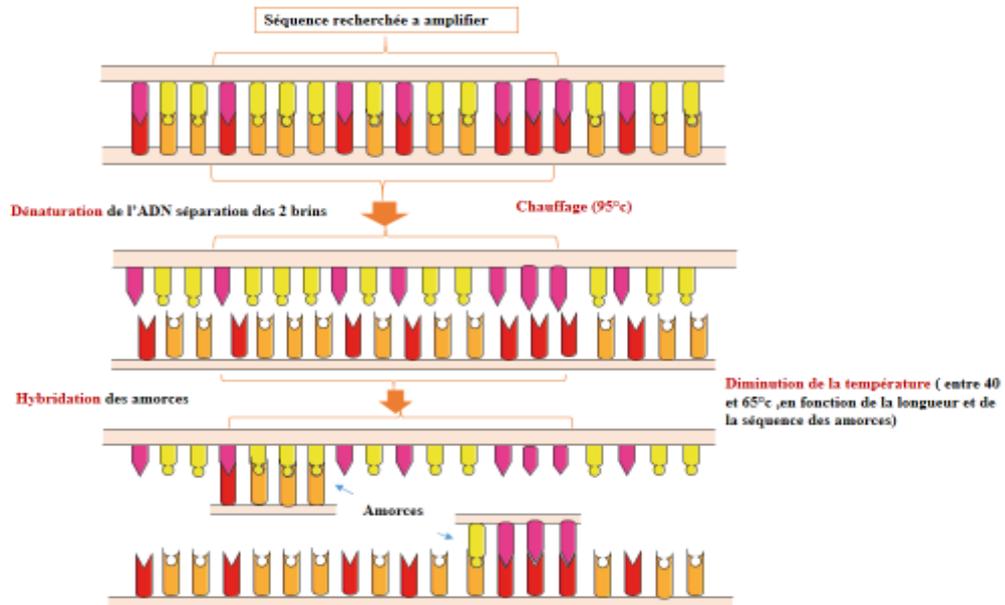


Figure 1.14 : les étapes cruciales d'amplification.

**L'élongation :** (70° à 72°C) : extension des amorces avec ADN Pol, la durée de cette étape dépend de la longueur de l'amplicon (figure 1.15).

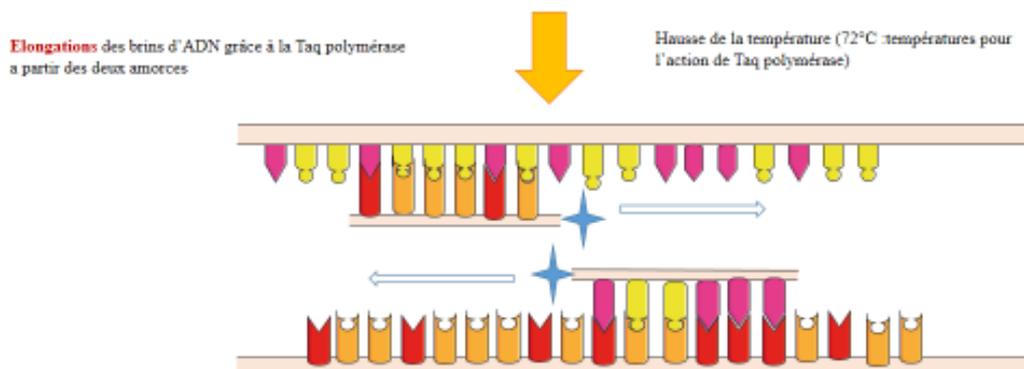


Figure 1.15 : Etape d'élongations à l'aide de Taq polymérase.

### 1.1.7 La Taq pol

ADN pol non inactivée par la chaleur, Isolée d'une Bactérie thermophile adaptée à la vie dans des sources d'eau chaude : *Thermus aquaticus*, Il est possible maintenant d'automatiser ces réactions grâce à des Cycleurs thermiques (programmable en t° et en tps)(figure 1.16).

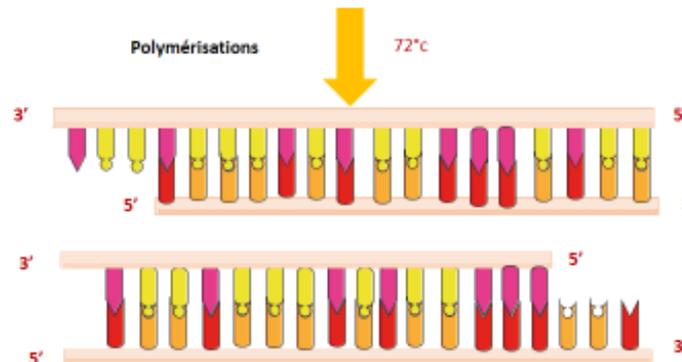


Figure1. 16 : polymérisation à l'aide de taq polymérase.

## 1.5. Amorces

### 1.5.1. Définition

Les Oligonucleotides d'ADN monocaténaire ont une longueur de 16-30 nucléotides, ces amorces initient travail de la Taq Pol utiliser pour la réplication d'ADN lors de la PCR, leur température d'hybridation est 5°C plus bases que la température de fusion.

### 1.5.2. Conception d'amorce par PCR

Une amorce mal conçue peut empêcher le fonctionnement de la réaction PCR, leur séquence d'amorces détermine la position et la longueur du produit, sa température de fusion peut conduire à une production faible en raison d'une amplification spécifique qui peuvent devenir suffisamment compétitif qui inhiber la formation de produit amplifier

### 1.5.3. Sélection d'amorces

Selon plusieurs variables :

- Longueur d'amorce
- Température de fusion
- Spécificité
- Séquences d'amorces complémentaires
- Teneur en G/C et suites polypyrimidine (T, C) ou polypurine (A, G)
- Séquence à l'extrémité

### Problématique

Immunité anti-infectieuse c'est la réponse de l'hôte aux agressions pathologique qui implique des réponses immunitaire innées et adaptative caractérise principalement par une réponse a macrophage plusieurs études signalé le rôle de TLR4 comme inducteur d'inflammation en réponse à l'infection en induisent la sécrétion des cytokines inflammatoire.

**Objectif** de cette étude est de concevoir des amorces spécifique pour le gène TLR4 a l'aide de logiciel primer blast.

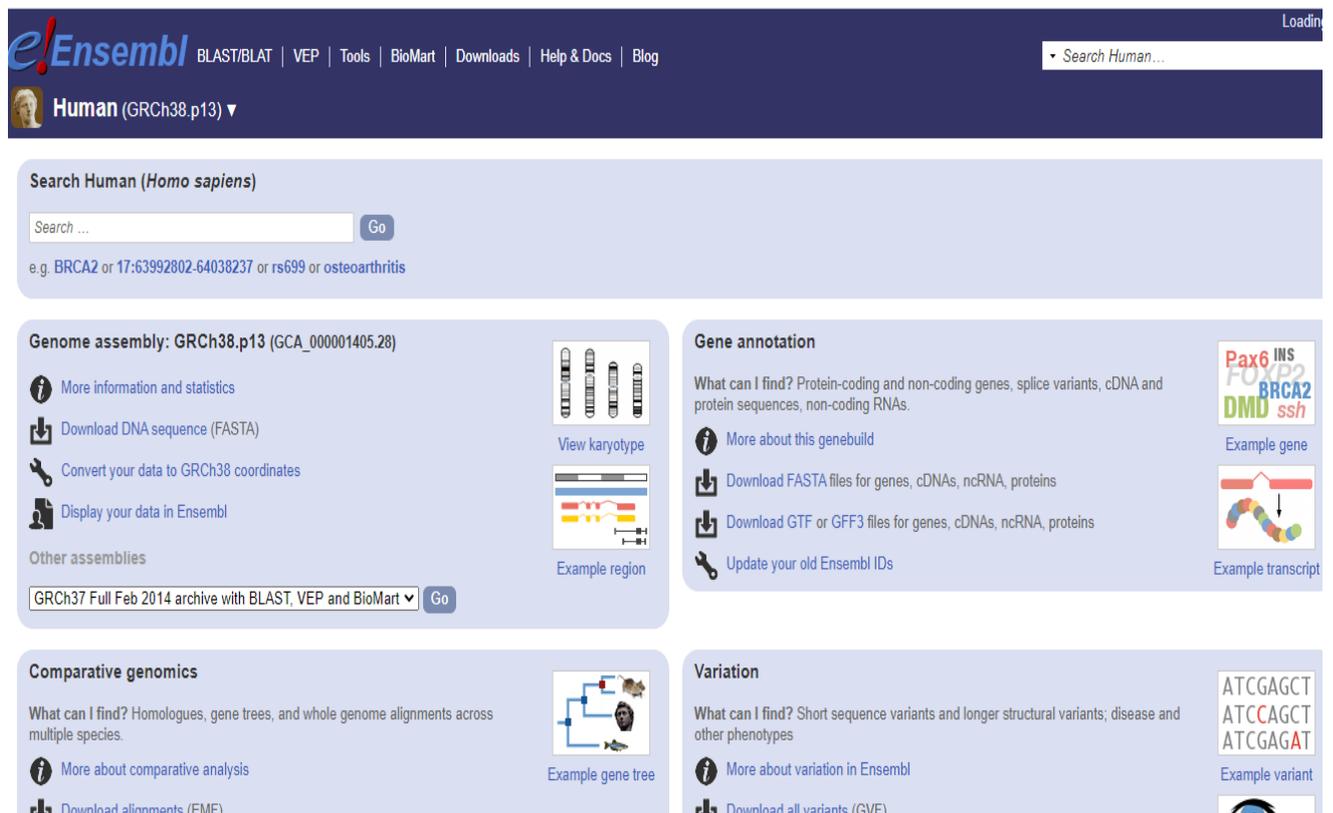
**But :** utilisation des amorces dans les analyses a PCR dans les futures études d'association génétique de gène TLR4 aux maladies infectieuse.

### Matériel et Méthodes

#### 2. Gène TLR4

Le gène TLR4 2965 Pb contient un cadre de lecteur ouvert de 2526pb codant 841 acides aminés 470pb 5' non traduits (UTR) et 743pb 3' UTR .Ce gène se localise dans le Chr9 humain codée pour la protéine de membrane de famille des récepteur TLR qui contient un domaine comprend une peptide signal, un domaine d'hélice transmembranaire, 3 sortes de domaine de réplication riche en leucine (LRR, LRR-TYP ,LRR -CT) et un domaine de résistance à l'interleukine 1(TIR) reconnais une large variété des motif antigénique PAMP ainsi implique dans les évènements de transduction de signaux induits par LPS et l'activation de l'immunité innée.

La séquence du gène TLR4 a été introduite dans la base de données ensemble (www.ensembl.org) en inscrivant le nom du gène et spécifié l'espèce humaine (figure 2.1).



The screenshot displays the Ensembl genome browser interface. At the top, there is a navigation bar with the Ensembl logo and links for BLAST/BLAT, VEP, Tools, BioMart, Downloads, Help & Docs, and Blog. A search bar is located on the right side of the navigation bar. Below the navigation bar, the main content area is divided into several panels. The top panel is the search bar, which has been used to search for the TLR4 gene. The search results show the gene name and its location on chromosome 9 (GRCh38.p13). Below the search bar, there are four main panels: 1. Genome assembly: GRCh38.p13 (GCA\_000001405.28). This panel provides options to view more information, download DNA sequence (FASTA), convert data to GRCh38 coordinates, and display data in Ensembl. It also shows other assemblies and a dropdown menu for selecting a specific assembly. 2. Gene annotation. This panel provides information about the gene, including protein-coding and non-coding genes, splice variants, cDNA, and protein sequences. It offers options to download FASTA files, GTF or GFF3 files, and update old Ensembl IDs. 3. Comparative genomics. This panel allows users to find homologues, gene trees, and whole genome alignments across multiple species. It provides options to view more about comparative analysis and download alignments (EMF). 4. Variation. This panel allows users to find short sequence variants and longer structural variants, as well as disease and other phenotypes. It provides options to view more about variation in Ensembl and download all variants (GVF). The interface is clean and user-friendly, with clear navigation and informative content.

Figure 2.1: Plateforme de la base de données Ensembl.

## Chapitre 2 . Matériel et méthode

### 2.1 Recherche de la séquence de référence du gène TLR4

La plateforme de la base de données montre où la séquence complète du gène peut être trouvée sous le code ENSG00000136869. (Figure 2.2).

The screenshot shows the Ensembl search results for 'TLR4'. The search bar at the top contains 'ensembl.org/Multi/Search/Results?q=TLR4:site=ensembl\_all'. On the left, there are navigation options like 'Per page:' (10, 25, 50, 100) and 'Layout:' (Standard, Table). The main content area displays search results for 'TLR4-202 (Human Transcript)', 'TLR4-201 (Human Transcript)', 'TLR4-203 (Human Transcript)', and 'TLR4-204 (Human Transcript)'. Each result includes the transcript ID, gene name, and a brief description. There are also results for mouse genes: 'Tlr4 (Mouse Gene, Strain: reference (CL57BL6))' and 'Tlr4-004 (Vega transcript)'. Navigation links like 'Location', 'External Refs.', 'cDNA seq.', 'Exons', 'Variant table', 'Protein seq.', 'Population', and 'Protein summary' are provided for each entry.

Figure 2.2 : Introduction du gène TLR4 dans la base de données ENSEMBL.

Il existe 4 pseudo gènes apparentés : TLR4-201, TLR4-202, TLR4-203, TLR4-204 (figure 2.3).

The screenshot shows the Ensembl gene page for 'Gene: TLR4' (ENSG00000136869). The page includes a navigation menu on the left with options like 'Summary', 'Splice variants', 'Transcript comparison', 'Gene alleles', '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', 'Supporting evidence', 'ID History', and 'Gene history'. The main content area shows the gene description: 'toll like receptor 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11850]'. It also lists gene synonyms (ARM10, CD284, TLR-4, hToll) and location (Chromosome 9: 117,704,175-117,724,735 forward strand). A table of transcripts is displayed with the following data:

Name	Transcript ID	bp	Protein	Biotype	CCDS	UniProt	RefSeq Match	Flags
TLR4-201	ENST0000035622.8	12677	839aa	Protein coding	CCDS6818.1	O00206	NM_138554.5	TSL:1 GENCODE basic APPRIS P1 MANE Select v0.7
TLR4-202	ENST00000394487.5	4048	799aa	Protein coding	-	O00206	-	TSL:1 GENCODE basic
TLR4-203	ENST00000472304.2	2955	32aa	Protein coding	-	A0A2R8Y7P4	-	TSL:1 GENCODE basic
TLR4-204	ENST00000490685.1	539	No protein	Processed transcript	-	-	-	TSL:3

Below the table is a 'Summary' section with the following information:

- Name: TLR4 (HGNC Symbol)
- CCDS: This gene is a member of the Human CCDS set: CCDS6818.1

Figure 2.3 : code donnée pour le gène TLR4.

## Chapitre 2 . Matériel et méthode

### 2.2 Séquence du gène TLR4 :

Nous avons situé, ensuite, notre paire d'amorces dans la séquence du transcrit du gène TLR4 montré dans la figure 2.4.

The image shows two screenshots. The top one is from a bioinformatics tool (likely NCBI) displaying the genomic context and sequence of the TLR4 gene. It includes a 'Download sequence' button, a 'BLAST this sequence' button, and a 'Markup loaded' status. The sequence is shown in a window with a title bar that reads '>chr09:GRCh38:9:117703575:117725395:1'. The sequence is color-coded to show exons and introns. The bottom screenshot shows a Microsoft Word document with the same sequence pasted into it. The Word interface includes the ribbon (Accueil, Insertion, Conception, Mise en page, Références, Publipostage, Révision, Affichage, Zotero, Aide) and the ribbon tabs (Police, Paragraphes, Styles). The sequence is pasted into the document body, and the Word status bar at the bottom indicates '12 363 mots' and 'Français (France)'.

Figure 2.4. La séquence du transcrit de TLR4 est ensuite copiée dans un document Word afin de faciliter son utilisation.

### 2.3 Le désigne de primer

L'outil primer -blast Nous permet une conception d'amorces les plus spécifiques de la séquence que l'on veut amplifier, est retrouvé dans la base de données (ncbi) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Les figures suivantes représentent les étapes à suivre dans l'utilisation de cet outil (figure2.5).

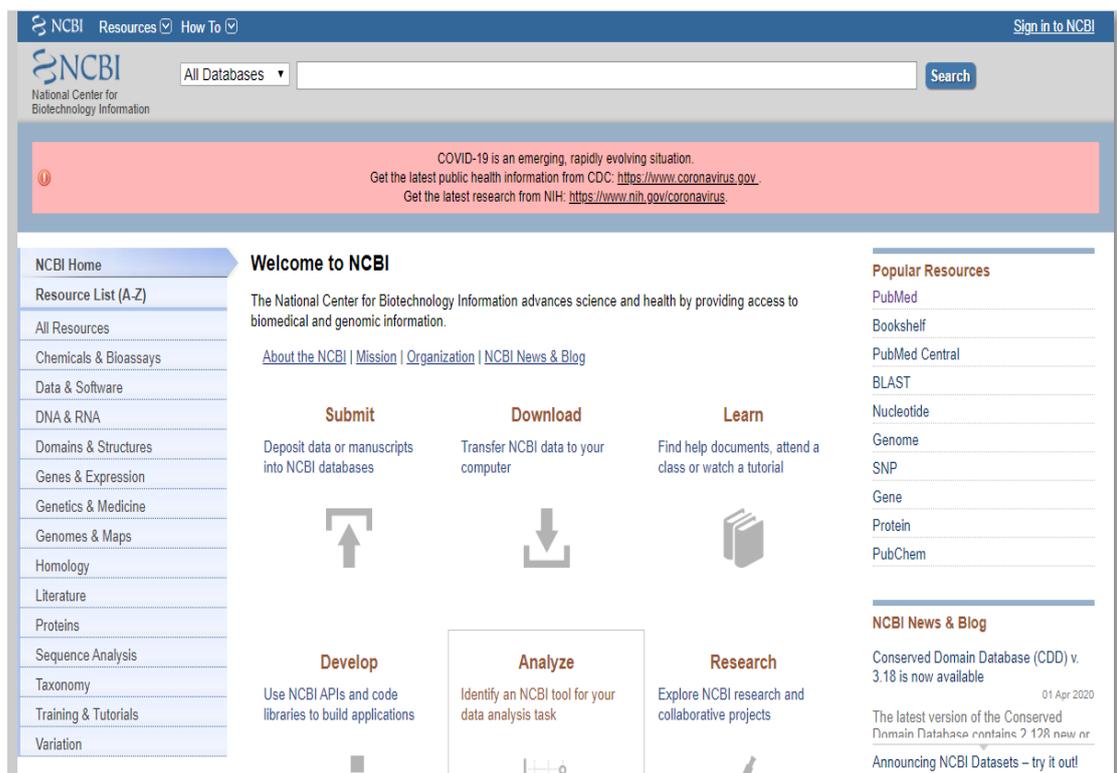
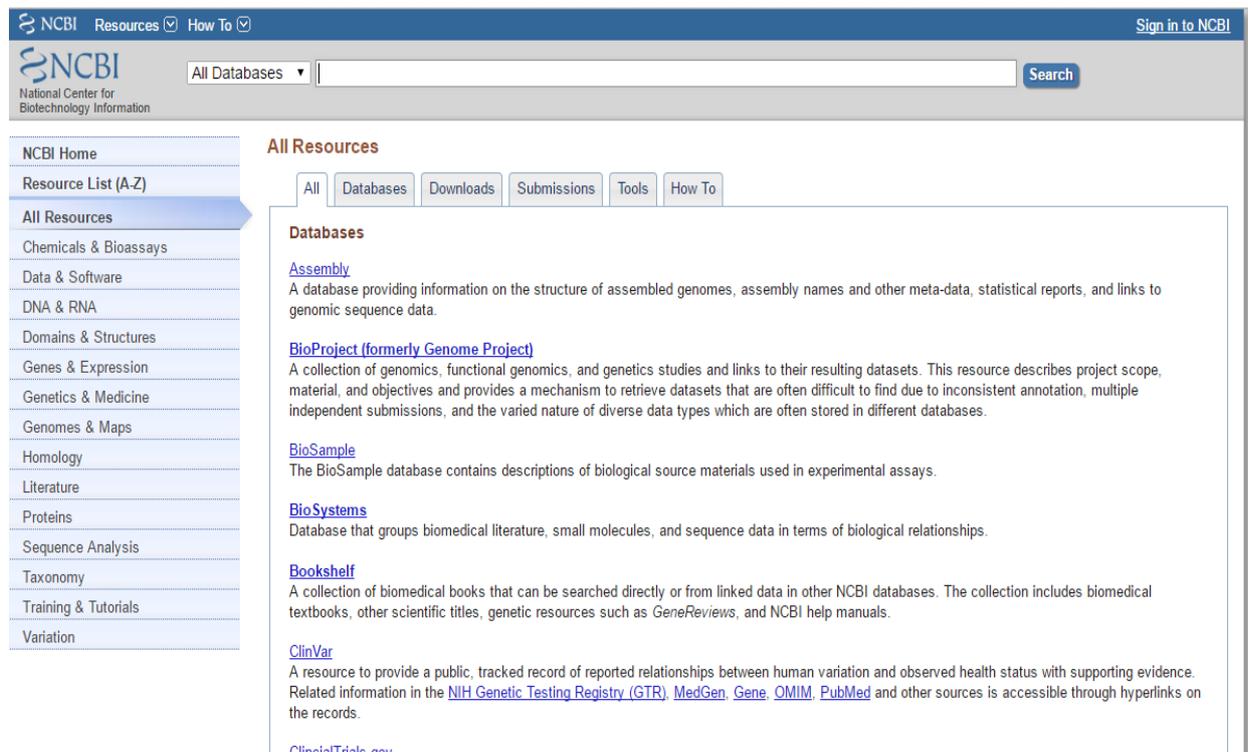
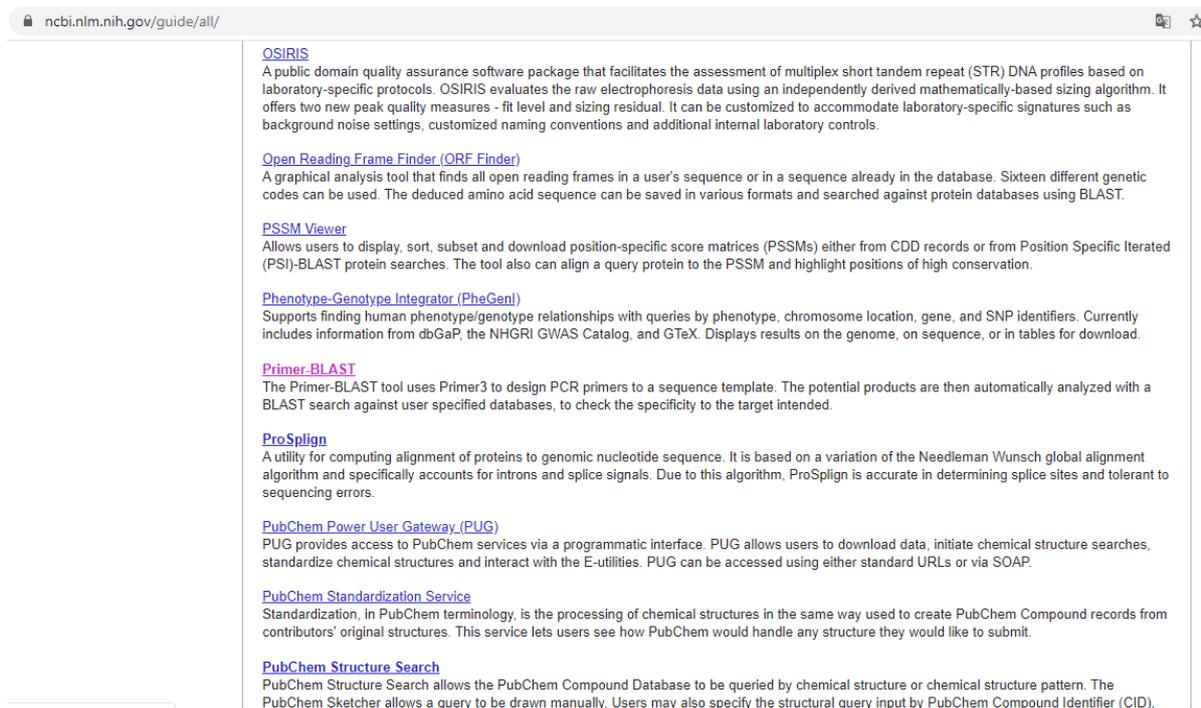


Figure 2.5 : Plateforme de la banque de donnée du NCBI.





ncbi.nlm.nih.gov/guide/all/

[OSIRIS](#)  
A public domain quality assurance software package that facilitates the assessment of multiplex short tandem repeat (STR) DNA profiles based on laboratory-specific protocols. OSIRIS evaluates the raw electrophoresis data using an independently derived mathematically-based sizing algorithm. It offers two new peak quality measures - fit level and sizing residual. It can be customized to accommodate laboratory-specific signatures such as background noise settings, customized naming conventions and additional internal laboratory controls.

[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.

[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.

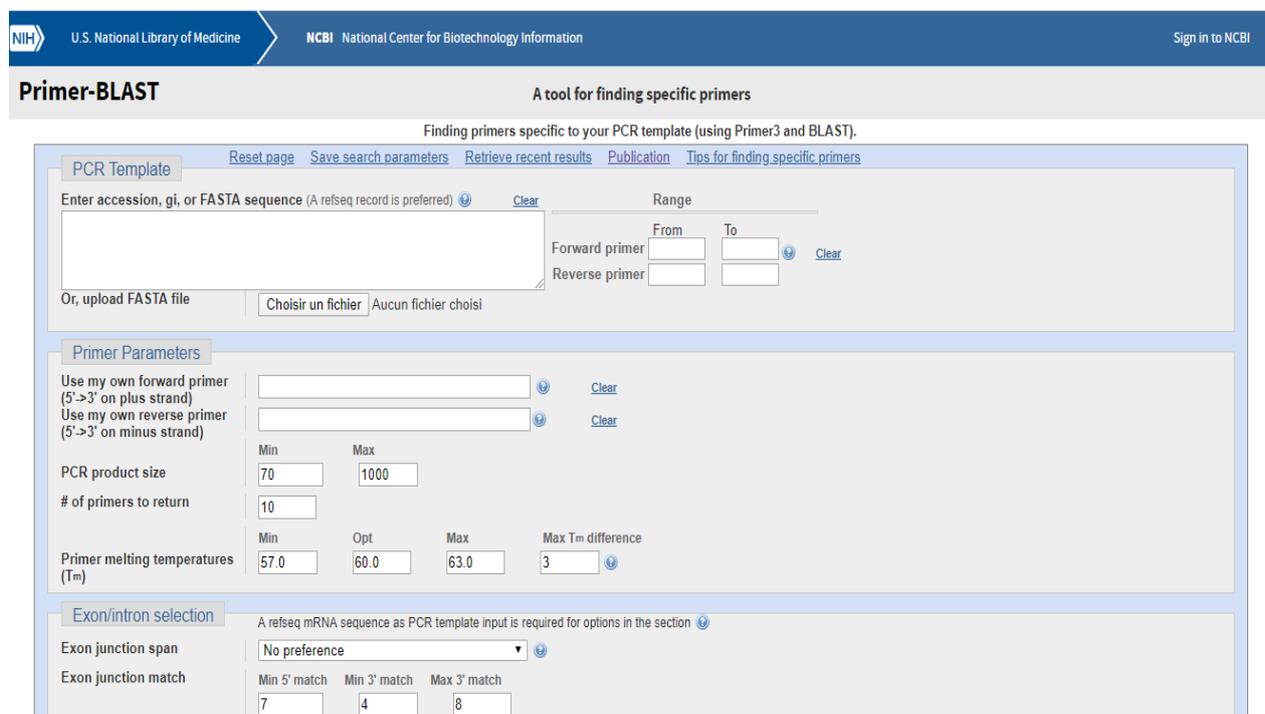
[ProSplign](#)  
A utility for computing alignment of proteins to genomic nucleotide sequence. It is based on a variation of the Needleman Wunsch global alignment algorithm and specifically accounts for introns and splice signals. Due to this algorithm, ProSplign is accurate in determining splice sites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

.Ce Logiciel (Primer3) (Ye et al, 2012) est retrouvé en ligne en libre-service, dans la banque de données (ncbi) (www.ncbi.nlm.nih.gov). Il présente une interface facile à utiliser (figure 2.6)



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

Forward primer  From  To  [Clear](#)

Reverse primer

Or, upload FASTA file  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  Max

# of primers to return

Primer melting temperatures (T<sub>m</sub>) Min  Opt  Max  Max T<sub>m</sub> difference  [Clear](#)

**Exon/intron selection**

A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section [Clear](#)

Exon junction span  [Clear](#)

Exon junction match Min 5' match  Min 3' match  Max 3' match

Figure 2.6 : interface de logiciel primer-blast.

## Chapitre 2 . Matériel et méthode

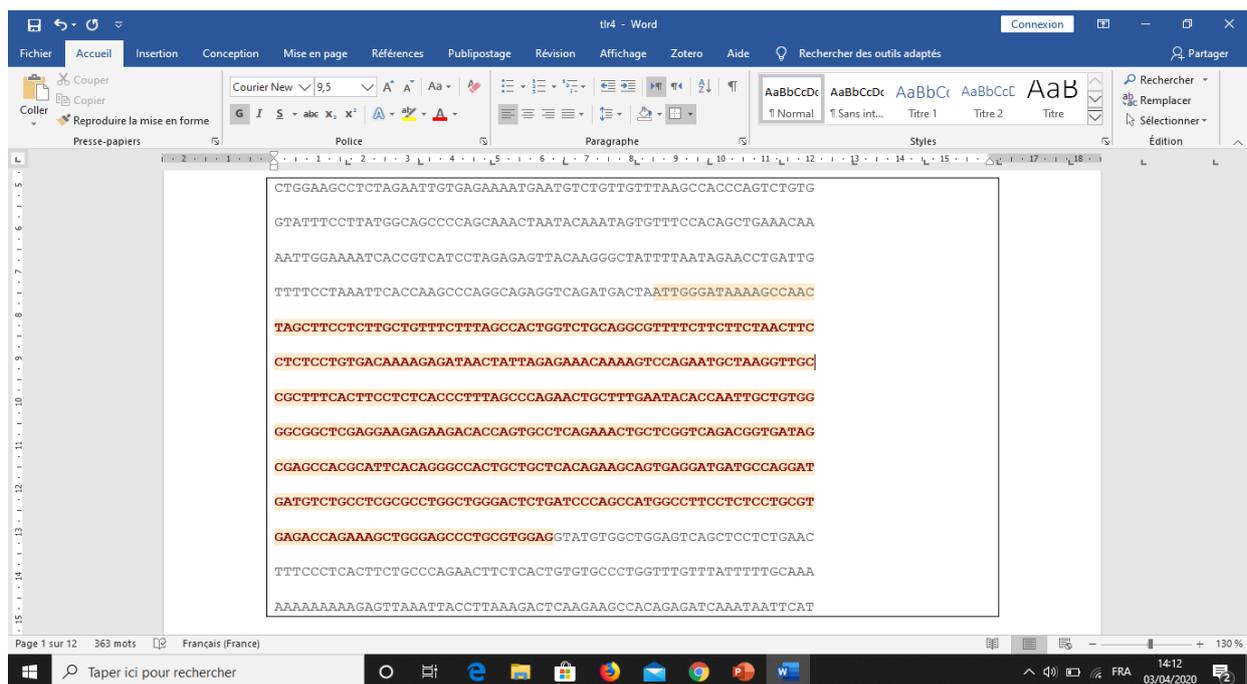
### 3. Analyse des Résultats du Primer Blast :

Le couple d'amorces choisi doit répondre aux critères suivant :

- Choisir le couple d'amorces qui donne le moins de produits aspécifiques, afin D'amplifier que le produit étudié
- Les températures d'hybridation des deux amorces doivent être le plus proches

Possibles, car la température d'hybridation lors d'une PCR est programmé en une Seule température.

- La teneur en GC doit être proche de 40%
- Ignorer les produits aspécifiques de plus de 1000 Pb, car lors d'une PCR il est moins probable d'amplifier une séquence de plus de 1kb.



**Figure 2.7 :** séquence du gène TLR4 prise depuis la base de données Exemple. Cette séquence est copiée dans un document Word, et la séquence d'intérêt est encadrée.

# Chapitre 2 . Matériel et méthode

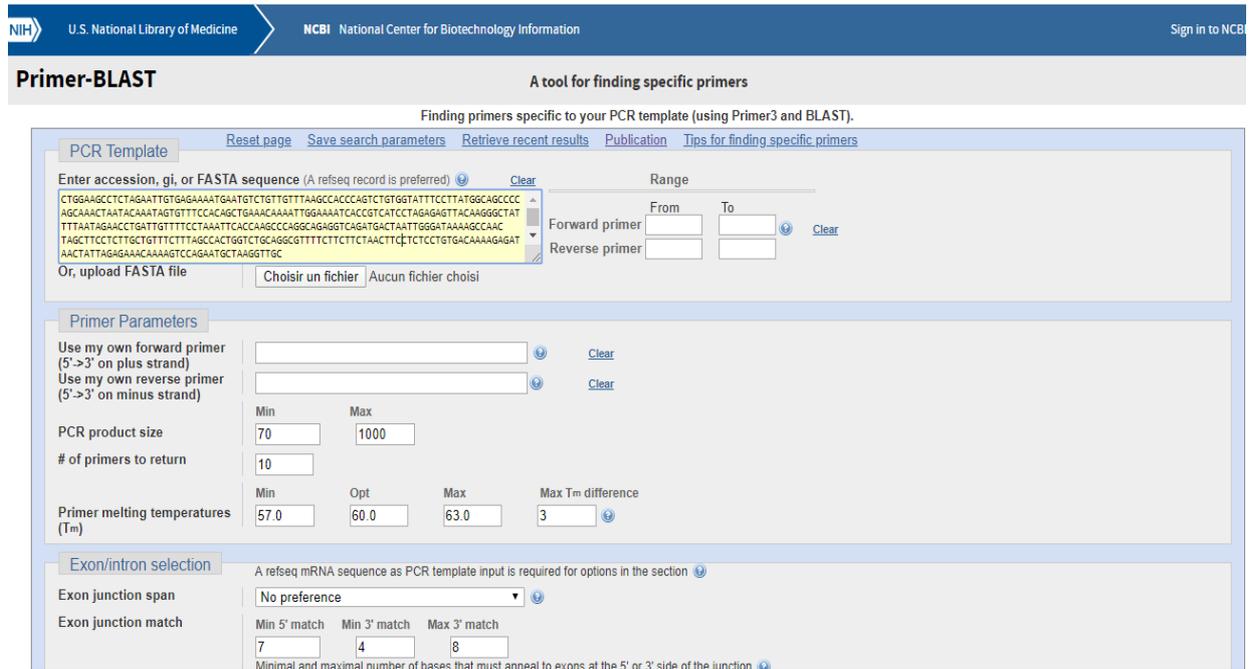
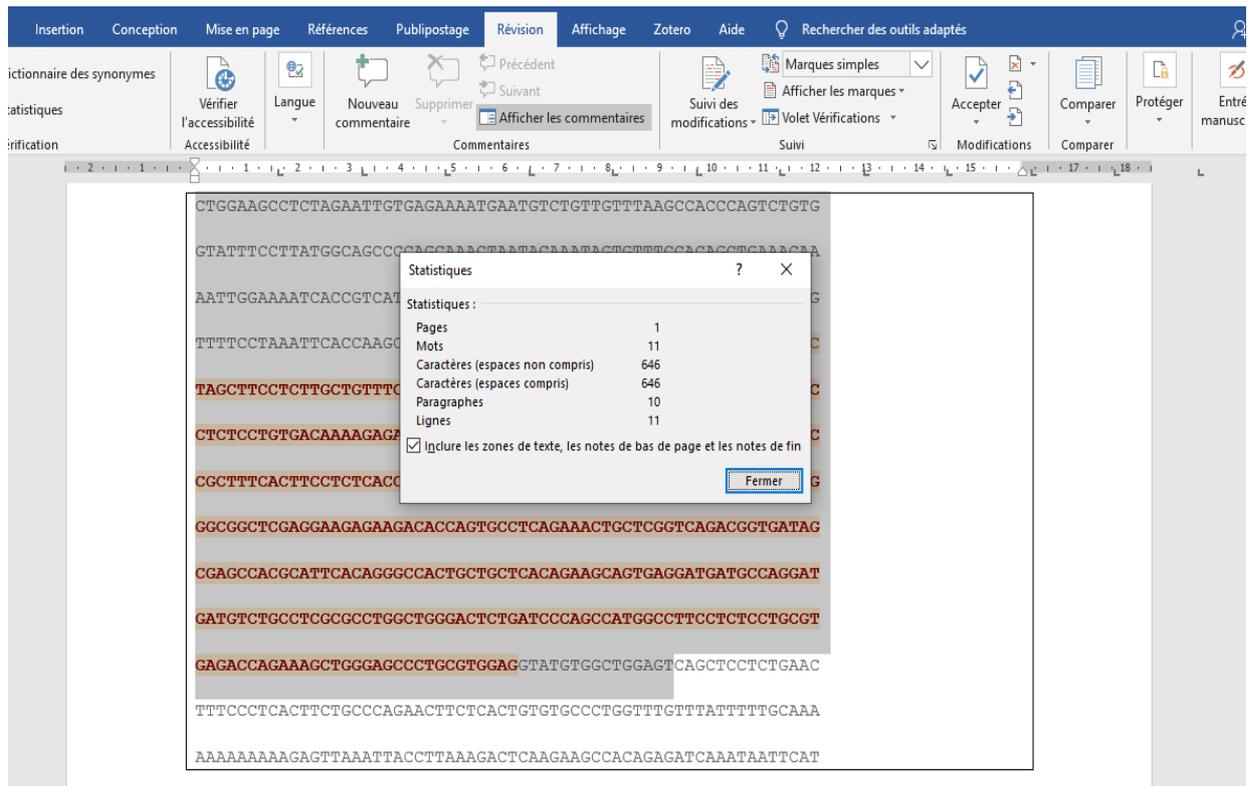


Figure 2.8 : copier la sequence dans l'interface de base de donnee.



## Chapitre 2 . Matériel et méthode

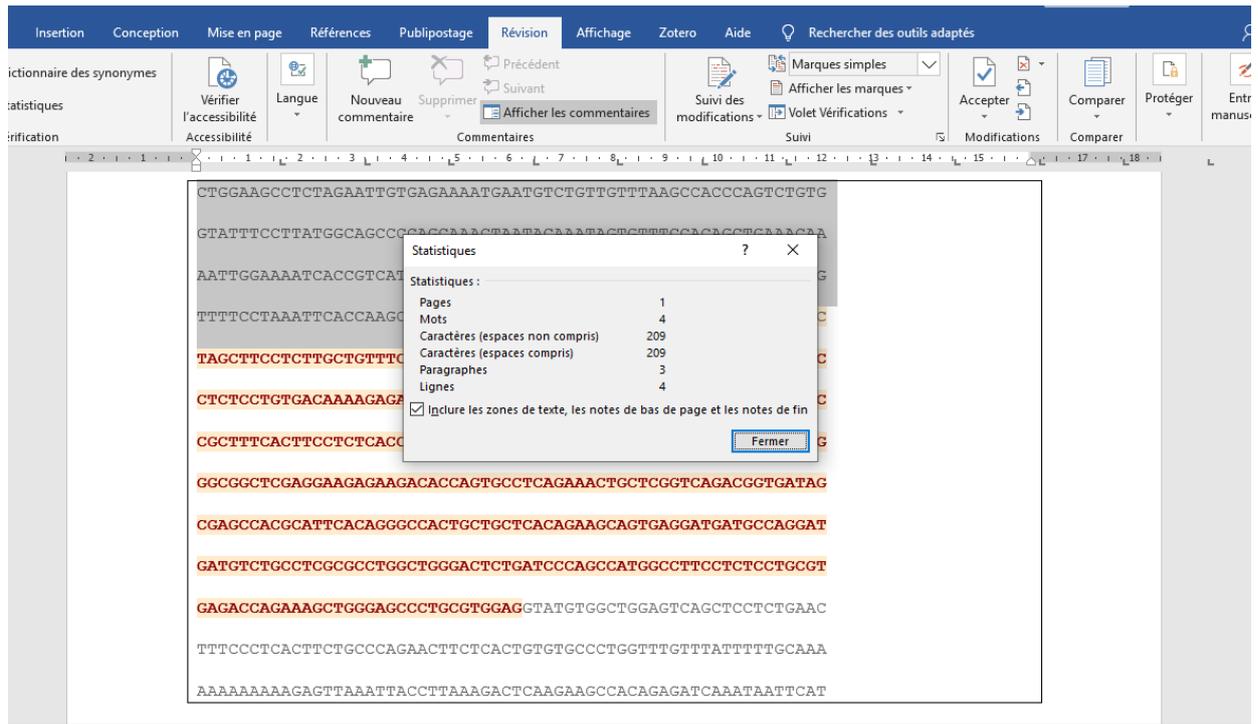


Figure 2.9 : statistique d'une sequence de produit amplifier.

## Primer-BLAST

A tool for finding specific primers

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

PCR Template [Reset page](#) [Save search parameters](#) [Retrieve recent results](#) [Publication](#) [Tips for finding specific primers](#)

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred) [Clear](#)

```
CTGGAAGCCTCTAGAATTGTGAGAAAATGAATGCTGTGTTTAAAGCCACCCAGTCTGGTATTTCCTATGGCAGCCCC
AGCAAACATAACAATAGTGTTCACAGCTGAAACAAAATGGAAAATCACCGTCATCCTAGAGAGTTACAAGGGCTAT
TTTAAAGAACCTGATGTTTCCATAAATCACCAAGCCCAGGCAGAGGTGAGATGACTAATGGGATAAAGCCAAC
TAGCTTCCTCTGCTGTTTCTTAGCCACTGGTCTGAGGCGTTTTCTCTTAACCTCCTCTGTGACAAAAGGAT
AACTATTAGAGAAAACAAAGTCCAGAACTGTAAGGTTGC
```

Or, upload FASTA file  Aucun fichier choisi

Range

Forward primer From 1 To 209 [Clear](#)

Reverse primer 646 [Clear](#)

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 (T<sub>m</sub>) Min 57.0 Opt 60.0 Max 63.0 Max T<sub>m</sub> difference 3 [Clear](#)

Exon/intron selection

A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section [Clear](#)

Exon junction span No preference [Clear](#)

Exon junction match

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

Minimal and maximal number of bases that must anneal to exons at the 5' or 3' side of the junction [Clear](#)

Intron inclusion  Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA [Clear](#)

Intron length range Min Max

## Chapitre 2 . Matériel et méthode

→ [ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/](https://ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)

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

Intron length range  
 Min:  Max:

**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:

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:   
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  total mismatches to unintended targets, including at least  mismatches within the last  bps at the 3' end. Ignore targets that have  or more mismatches to the primer.

Max target size:

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**

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)

**Input PCR template** |   
**Range** |

Your PCR template is highly similar to the following sequence(s) from the search database. To increase the chance of finding specific primers, please review the list below and select all sequences (within the given sequence ranges) that are intended or allowed targets.

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Accession	Title	Identity	Alignment length	Seq. start	Seq. stop	Gene
<input type="checkbox"/> NC_000009.12	Homo sapiens chromosome 9, GRCh38.p13 Primary Assembly	100%	780	117703935	117704714	<a href="#">TLR4</a>

Show results in a new window

BLAST is a registered trademark of the National Library of Medicine | [Support center](#) | [Mailing list](#)

NCBI National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine  
 1600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA  
[Policies and Guidelines](#) | [Contact](#)

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE | NIH | USA.gov

## Chapitre 2 . Matériel et méthode

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

### Primer-BLAST

A tool for finding specific primers

Making primers specific to your PCR template. [more...](#)

Status	Running	<a href="#">Check</a>	<a href="#">Cancel</a>
Current time	03 April 2020, 08:20:12		
Time since submission	31 sec		
Progress Message			

BLAST is a registered trademark of the National Library of Medicine | [Support center](#) | [Mailing list](#)

NCBI  
National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine  
8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA

[Policies and Guidelines](#) | [Contact](#)

### 3.1. Les amorces encadrent le transcrit de gène TLR4 :

10 couples d'amorces hautement spécifiques ont été obtenus. Les résultats sont représentés dans les figures cidessous .

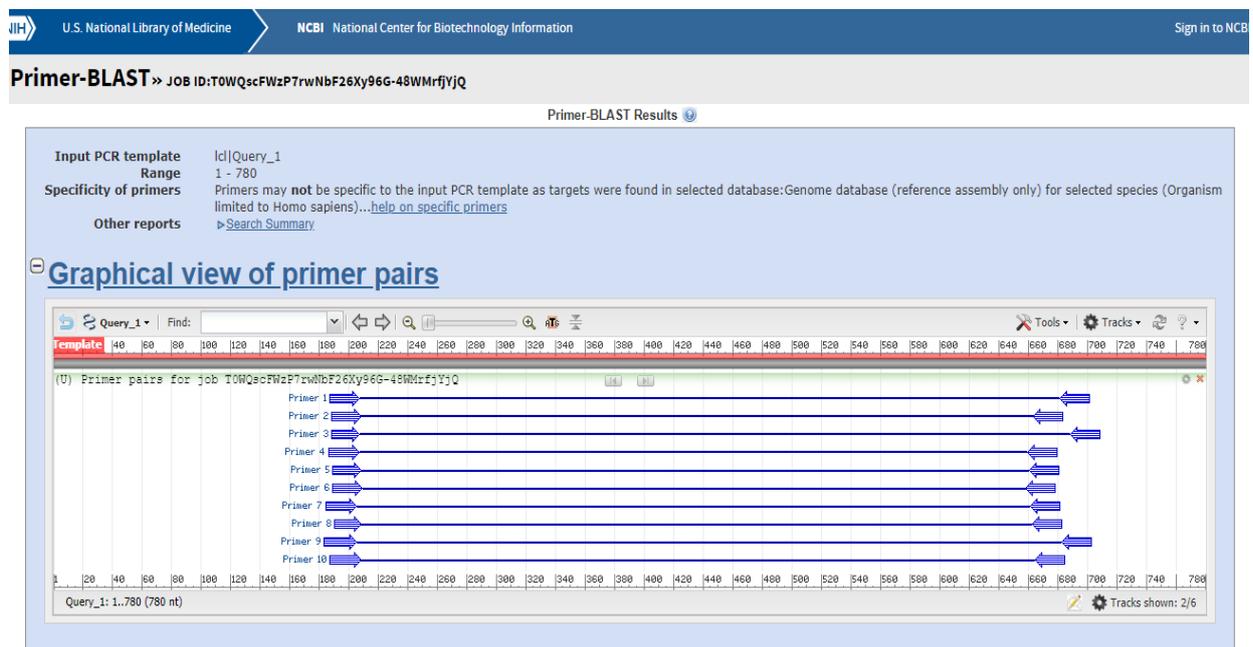


Figure 2.10 : représentation graphique de 10 paires d'amorces encadrent le transcrit de gène TLR4.

## Chapitre 2 . Matériel et méthode

Par la suite pour faciliter la recherche des amorces spécifiques de ce gène, une séquence du gène TLR4 qui comporte l'intron et l'exon plus précisément l'exon 1 a été copié et collé dans un document Word.



La conception d'amorce du gène : AL160272.2

Code : ENSG00000285082, Chromosome 9: 117,704,157-118,072,314

**Figure 2.11** : les paires d'amorces obtenue avec l'outil primer- blast, encadrent une partie du transcrit du gène TLR4.

## Chapitre 3: Résultats

### RESULTATS:

Les résultats de conception d'amorce du gène TLR4 de l'exon 1 c'est la première paire d'amorce qui se représente dans la figure suivant :

The screenshot shows the Primer-BLAST web interface. The main heading is "Primer-BLAST: A tool for finding specific primers". Below this, there are several sections for configuring the search:

- PCR Template:** Includes a text input for "Enter accession, gi, or FASTA sequence" and a "Range" section with "From" and "To" fields.
- Primer Parameters:** Includes fields for "Use my own forward primer", "Use my own reverse primer", "PCR product size" (Min: 75, Max: 1000), and "# of primers to return" (set to 10).
- Primer melting temperatures (T<sub>m</sub>):** Includes fields for "Min" (57.0), "Opt" (60.0), "Max" (63.0), and "Max T<sub>m</sub> difference" (set to 3).
- Exon/intron selection:** Includes a dropdown for "Exon junction gaps" (set to "No preference") and fields for "Exon junction match" (Min 5, Min 2, Max 3).
- Intron inclusion:** Includes a checkbox for "Primer gap must be preceded by at least one intron" and a field for "Intron length range" (Min: 1000, Max: 100000).

Figure 2.12 : Analyse de la séquence d'intérêt par le primer Blast.

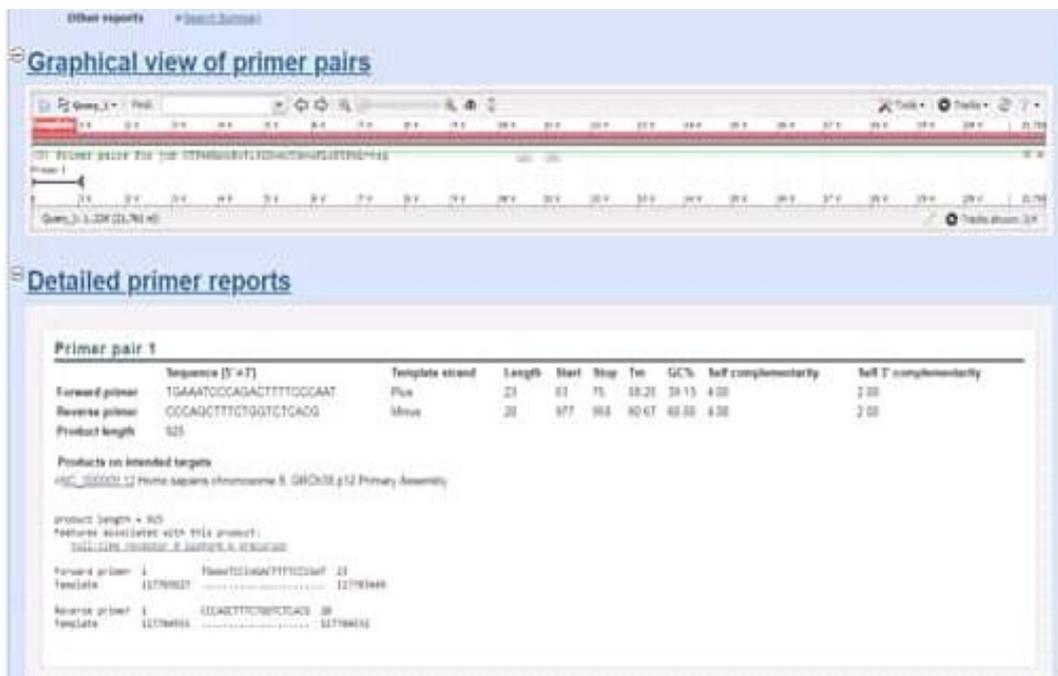


Figure 2.13 : Résulta de primer Blast.

## Chapitre 3: Résultats

Le logiciel Primer-Blast présente les résultats pour chaque paire d'amorces incluant :

- les longueurs d'amorces respectives.
- leur température de fusion (Tf).
- leur pourcentage en GC.
- la longueur du produit amplifié.

Toutes les paires d'amorces obtenus sont spécifiques de la séquence du gène TLR4 et amplifierait des séquences de taille allant de 551pb à 2965 pb.

Au cours de ce travail nous avons choisis la deuxième paire d'amorces pour les raisons suivantes :

Les températures d'hybridation des amorces est de 60°C, cela est en faveur d'un choix d'une température intermédiaire à inscrire dans l'étape d'hybridation des amorces dans le thermocycleur.

Les longueurs des amorces sont 20 nucléotides dont les oligonucléotides entre 15 et 20 bases sont extrêmement spécifiques de la séquence.

La teneur en GC est de 55% et 45 pour l'amorce sens et anti sens respectivement. L, lorsque la teneur en GC d'une amorce doit être comprise entre 40 et 50%. Ce qui renforce notre choix pour cette deuxième paire.

### Confirmation de résultats

Une analyse de confirmation qui se fait par le site <http://genome.ucsc.edu>, les résultats de cette confirmation ont donné le produit situé sur le chromosome 9, Donc ces résultats nous confirment la fiabilité et la spécificité des amorces que nous avons conçues. (figure 2.14).



The screenshot shows the UCSC In-Silico PCR tool interface. At the top, there is a navigation bar with links for Genomes, Genome Browser, Tools, Mirrors, Downloads, My Data, Projects, Help, and About Us. Below the navigation bar, the tool title "UCSC In-Silico PCR" is displayed. The main content area shows a DNA sequence for chromosome 9, with coordinates 117784895-117784645 and a length of 551bp. The sequence is: >chr9:117784895-117784645 551bp TTGGCCAGTACTCTGAAGC CGAACTCCGGACATTGAGGA TTGGCCAGTACTCTGAAGCcacaccacacacttgtgcaggctggagatt ggggagcagcacacctgaggggtgaaggatctgtgtgactgaagaga tattgatcatgacctccgagccacacaaattgggctactaagttc acctgaataaagagttgcccaggtctctgagctgttttcttc tatcgaaggcattactacacctgctttgtccacctccaggagtgtta tgggctctgattgagatagggcaatccagagcctcctgtaacag gttgcagcaagcctaagatgaatggccaaatcagagatcaga acttgtgtctggttttacctgtgacataaacacagcagatgaattggg taegtcttactctctgatttaaatcttttaactaaattgggg attgactgggctgttaaigtctttgtgctcattagacccttaagg actgggaaagctaggactttactgcccTCCTCAATGTCGGAAGTTC G. Below the sequence, the "Primer Melting Temperatures" section is visible, showing: Forward: 60.4 C ttggcccagctactctgaagc Reverse: 64.6 C cgaactccggacattgagga. A note at the bottom states: "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 2.14 : Confirmation des Résultats par le site UCSC in silico PCR

## Chapitre4. Conclusion

---

---

### Conclusion

Au cours de ce travail, nous avons pu accéder aux séquences génomiques des gènes codant TLR4 ainsi qu'aux séquences de leur transcrits.

Ainsi nous avons pu concevoir des amorces spécifiques encadrant une partie du transcrit du gène TLR4 grâce au logiciel en ligne Primer-Blast. La séquence de l'amorce Forward (sens) : 5'TGAAATCCCAGACTTTTCCCAT3' Et la séquence de l'amorce Reverse (antisens) : 5'CCCAGCTTTCTGGTCTCACG3'

Ces deux couples d'amorces ont une température d'hybridation optimale pour le bon déroulement d'une PCR, ont un pourcentage en GC supérieure à 40% et les séquences d'amorce sont compatibles entre elles, réunissant ainsi de bonnes conditions pour leur utilisation ultérieure.

Ces amorces seront utilisées pour l'amplification des transcrits cités afin de détecter leur présence ou absence, d'une part, et rechercher des mutations ou de variations de séquences d'autre part.

Ainsi ces amorces seront utilisée lors d'une PCR sert à quantifier l'ADN de gène de TLR4 et analyser leur niveau de régulation dans les cas ayant des infections.

Cette étude nous permet de reconnaître et d'utiliser des outils de la bioinformatique tel que la recherche des séquences dans les bases de données, et de connaître toutes les caractéristiques essentielles au bon choix d'amorces spécifiques et compatibles entre elle pour un bon déroulement d'une amplification en PCR .

### Référence bibliographique

#### A

Aerbajinai, Wulin, Kevin Lee, Kyung Chin, et Griffin P. Rodgers. 2013a. « Glia Maturation Factor- $\gamma$  Negatively Modulates TLR4 Signaling by Facilitating TLR4 Endocytic Trafficking in Macrophages ». *The Journal of Immunology* 190(12):6093-6103.

#### B

Benoit, Marie, Benoît Desnues, et Jean-Louis Mege. 2008. « Macrophage Polarization in Bacterial Infections ». *The Journal of Immunology* 181(6):3733-39.

Blasi, Elisabetta, Anna Mucci, Rachele Neglia, Francesco Pezzini, Bruna Colombari, Danuta Radzioch, Andrea Cossarizza, Enrico Lugli, Gianfranco Volpini, Giuseppe Del Giudice, et Samuele Peppoloni. 2005. « Biological Importance of the Two Toll-like Receptors, TLR2 and TLR4, in Macrophage Response to Infection with *Candida Albicans* ». *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 44(1):69-79.

Bradley, William P., Mark A. Boyer, Hieu T. Nguyen, L. Dillon Birdwell, Janet Yu, Juliana M. Ribeiro, Susan R. Weiss, Dario S. Zamboni, Craig R. Roy, et Sunny Shin. 2016. « Primary Role for Toll-Like Receptor-Driven Tumor Necrosis Factor Rather than Cytosolic Immune Detection in Restricting *Coxiella Burnetii* Phase II Replication within Mouse Macrophages » édité par A. J. Bäumlér. *Infection and Immunity* 84(4):998-1015.

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

#### C

Calippe, Bertrand, Victorine Douin-Echinard, Muriel Laffargue, Henrik Laurell, Vanessa Rana-Poussine, Bernard Pipy, Jean-Charles Guéry, Francis Bayard, Jean-François Arnal, et Pierre Gourdy. 2008. « Chronic Estradiol Administration in Vivo Promotes the Proinflammatory Response of Macrophages to TLR4 Activation: Involvement of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway ». *The Journal of Immunology* 180(12):7980-88.

Carpenter, Susan, ET Luke A. J. O'Neill. 2009. « Recent Insights into the Structure of Toll-like Receptors and Post-Translational Modifications of Their Associated Signalling Proteins ». *Biochemical Journal* 422(1):1-10.

Chawla, Ajay, Khoa D. Nguyen, ET Y. P. Sharon Goh. 2011. « Macrophage-Mediated Inflammation in Metabolic Disease ». *Nature Reviews Immunology* 11(11):738-49.

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.

Cole, Caroline, Stacey Thomas, Holly Filak, Peter M. Henson, ET Laurel L. Lenz. 2012. « Nitric Oxide Increases Susceptibility of Toll-like Receptor-Activated Macrophages to Spreading *Listeria Monocytogenes* ». *Immunity* 36(5):807-20.

---

---

Cook, Donald N., David S. Pisetsky, and ET David A. Schwartz. 2004. « Toll-like Receptors in the Pathogenesis of Human Disease ». *Nature Immunology* 5(10):975-79.

**F**

Fairweather, DeLisa, ET Daniela Cihakova. 2009. « Alternatively Activated Macrophages in Infection and Autoimmunity ». *Journal of Autoimmunity* 33(3-4):222-30.

Fang, Weishan, Decheng Bi, Ruijin Zheng, Nan Cai, Hong Xu, Rui Zhou, Jun Lu, Min Wan, et Xu Xu. 2017. « Identification and Activation of TLR4-Mediated Signalling Pathways by Alginate-Derived Guluronate Oligosaccharide in RAW264.7 Macrophages ». *Scientific Reports* 7(1):1663.

Fu, Shu-Ling, Ya-Hui Hsu, Pei-Yeh Lee, Wen-Chi Hou, Ling-Chien Hung, Chao-Hsiung Lin, Chiu-Ming Chen, et Yu-Jing Huang. 2006. « Dioscorin Isolated from *Dioscorea Alata* Activates TLR4-Signaling Pathways and Induces Cytokine Expression in Macrophages ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 339(1):137-44.

**G**

Geissmann, F., M. G. Manz, S. Jung, M. H. Sieweke, M. Merad, ET K. Ley. 2010. « Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells ». *Science* 327(5966):656-61.

Gong, Jing, Jingbin Li, Hui Dong, Guang Chen, Xin Qin, Meilin Hu, Fen Yuan, Ke Fang, Dingkun Wang, Shujun Jiang, Yan Zhao, Wenya Huang, Zhaoyi Huang, et Fuer Lu. 2019. « Inhibitory Effects of Berberine on Proinflammatory M1 Macrophage Polarization through Interfering with the Interaction between TLR4 and MyD88 ». *BMC Complementary and Alternative Medicine* 19(1):314.

Guijarro-Muñoz, Irene, Marta Compte, Ana Álvarez-Cienfuegos, Luis Álvarez-Vallina, et Laura Sanz. 2014. « Lipopolysaccharide Activates Toll-like Receptor 4 (TLR4)-Mediated NF-KB Signaling Pathway and Proinflammatory Response in Human Pericytes ». *Journal of Biological Chemistry* 289(4):2457-68.

Greenberg, Steven, et Sergio Grinstein. 2002. « Phagocytosis and Innate Immunity ». *Current Opinion in Immunology* 14(1):136-45.

**H**

Han, Hongwei, Mark B. Headley, Whitney Xu, Michael R. Comeau, Baohua Zhou, et Steven F. Ziegler. 2013. « Thymic Stromal Lymphopoietin Amplifies the Differentiation of Alternatively Activated Macrophages ». *The Journal of Immunology* 190(3):904-12.

Huet, O., G. Choukroun, et J. Mira. 2004. « Récepteurs de type Toll, réponse inflammatoire et sepsis ». *Réanimation* 13(3):167-75.

**J**

Jakka, Padmaja, Bindu Bhargavi, Swapna Namani, Subathra Murugan, Gary Splitter, et Girish Radhakrishnan. 2018. « Cytoplasmic Linker Protein CLIP170 Negatively Regulates TLR4 Signaling by Targeting the TLR Adaptor Protein TIRAP ». *The Journal of Immunology* 200(2):704-14.

---

---

Janssens, S., et R. Beyaert. 2003. « Role of Toll-Like Receptors in Pathogen Recognition ». *Clinical Microbiology Reviews* 16(4):637-46.

**K**

Kawai, Taro, et Shizuo Akira. 2010. « The Role of Pattern-Recognition Receptors in Innate Immunity: Update on Toll-like Receptors ». *Nature Immunology* 11(5):373-84.

Kawai, Taro, et Shizuo Akira. 2011. « Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity ». *Immunity* 34(5):637-50.

Kopp, Elizabeth B., et Ruslan Medzhitov. 1999. « The Toll-Receptor Family and Control of Innate Immunity ». *Current Opinion in Immunology* 11(1):13-18.

Kuzmich, Nikolay, Konstantin Sivak, Vladimir Chubarev, Yuri Porozov, Tatiana Savateeva-Lyubimova, et Francesco Peri. 2017. « TLR4 Signaling Pathway Modulators as Potential Therapeutics in Inflammation and Sepsis ». *Vaccines* 5(4):34.

**L**

Latz, Eicke, Alberto Visintin, Egil Lien, Kate A. Fitzgerald, Brian G. Monks, Evelyn A. Kurt-Jones, Douglas T. Golenbock, et Terje Espevik. 2002. « Lipopolysaccharide Rapidly Traffics to and from the Golgi Apparatus with the Toll-like Receptor 4-MD-2-CD14 Complex in a Process That Is Distinct from the Initiation of Signal Transduction ». *Journal of Biological Chemistry* 277(49):47834-43.

Li, Qian, et Bobby J. Cherayil. 2003. « Role of Toll-Like Receptor 4 in Macrophage Activation and Tolerance during Salmonella Enterica Serovar Typhimurium Infection ». *Infection and Immunity* 71(9):4873-82.

Lv, Jingzhu, Xiaoyan He, Hongtao Wang, Zhaohua Wang, Gabriel T. Kelly, Xiaojing Wang, Yin Chen, Ting Wang, et Zhongqing Qian. 2017. « TLR4-NOX2 Axis Regulates the Phagocytosis and Killing of Mycobacterium Tuberculosis by Macrophages ». *BMC Pulmonary Medicine* 17(1):194.

**M**

Martinez, Fernando O., Laura Helming, et Siamon Gordon. 2009. « Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective ». *Annual Review of Immunology* 27(1):451-83.

Martinon, Fabio, Xi Chen, Ann-Hwee Lee, et Laurie H. Glimcher. 2010. « TLR Activation of the Transcription Factor XBP1 Regulates Innate Immune Responses in Macrophages ». *Nature Immunology* 11(5):411-18.

Mobarak, Edouard, Liliana Håversen, Moutusi Manna, Mikael Rutberg, Malin Levin, Rosie Perkins, Tomasz Rog, Ipo Vattulainen, et Jan Borén. 2018. « Glucosylceramide Modifies the LPS-Induced Inflammatory Response in Macrophages and the Orientation of the LPS/TLR4 Complex in Silico ». *Scientific Reports* 8(1):13600.

Molteni, Monica, Sabrina Gemma, et Carlo Rossetti. 2016. « The Role of Toll-Like Receptor 4 in Infectious and Noninfectious Inflammation ». *Mediators of Inflammation* 2016:1-9.

Muralidharan, Sujatha, Arlene Lim, Donna Catalano, et Pranoti Mandrekar. 2018. « Human Binge Alcohol Intake Inhibits TLR4–MyD88 and TLR4–TRIF Responses but Not the TLR3–TRIF Pathway: HspA1A and PP1 Play Selective Regulatory Roles ». *The Journal of Immunology* 200(7):2291-2303.

## P

Peri, Francesco, et Matteo Piazza. 2012. « Therapeutic Targeting of Innate Immunity with Toll-like Receptor 4 (TLR4) Antagonists ». *Biotechnology Advances* 30(1):251-60.

Parham, P. (2015).the immune system (Garland science, Taylor& Francis group, LLC).

Pipy, B. 2012. « Rôle des macrophages dans l'immunité anti-infectieuse et l'inflammation ». *Journal de Mycologie Médicale* 22(1):97-98.

Polycarpou, Anastasia, Martin J. Holland, Ioannis Karageorgiou, Ayad Eddaoudi, Stephen L. Walker, Sam Willcocks, et Diana N. J. Lockwood. 2016. « Mycobacterium leprae Activates Toll-Like Receptor-4 Signaling and Expression on Macrophages Depending on Previous Bacillus Calmette-Guerin Vaccination ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 6.

## R

Rogero, Marcelo, et Philip Calder. 2018. « Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids ». *Nutrients* 10(4):432.

## S

Satoh, Takashi, Osamu Takeuchi, Alexis Vandenbon, Koubun Yasuda, Yoshiaki Tanaka, Yutaro Kumagai, Tohru Miyake, Kazufumi Matsushita, Toshihiko Okazaki, Tatsuya Saitoh, Kiri Honma, Toshifumi Matsuyama, Katsuyuki Yui, Tohru Tsujimura, Daron M. Standley, Kenji Nakanishi, Kenta Nakai, et Shizuo Akira. 2010. « The Jmjd3-Irf4 Axis Regulates M2 Macrophage Polarization and Host Responses against Helminth Infection ». *Nature Immunology* 11(10):936-44.

Sharrocks, A.D. The design of primer for PCR. In : Griffin, H.G. and Griffin, A.M (Eds.) PCR Technology: Current Innovations. London : CRC Press, 1994 ; pp. 5–11.

Schink, Anne, Jan Neumann, Anna Lena Leifke, Kira Ziegler, Janine Fröhlich-Nowoisky, Christoph Cremer, Eckhard Thines, Bettina Weber, Ulrich Pöschl, Detlef Schuppan, et Kurt Lucas. 2018. « Screening of Herbal Extracts for TLR2- and TLR4-Dependent Anti-Inflammatory Effects » édité par D. M. Ojcius. *PLOS ONE* 13(10):e0203907.

Schmieder, Astrid, Julia Michel, Kathrin Schönhaar, Sergij Goerdt, et Kai Schledzewski. 2012. « Differentiation and Gene Expression Profile of Tumor-Associated Macrophages ». *Seminars in Cancer Biology* 22(4):289-97.

Schoeniger, Axel, Herbert Fuhrmann, et Julia Schumann. 2016. « LPS- or *Pseudomonas Aeruginosa* - Mediated Activation of the Macrophage TLR4 Signaling Cascade Depends on Membrane Lipid Composition ». *PeerJ* 4:e1663.

Shi, Chao, et Eric G. Pamer. 2011. « Monocyte Recruitment during Infection and Inflammation ». *Nature Reviews Immunology* 11(11):762-74.

## T

---

---

Taylor, P. R., L. Martinez-Pomares, M. Stacey, H. H. Lin, G. D. Brown, et S. Gordon. 2005. « MACROPHAGE RECEPTORS AND IMMUNE RECOGNITION ». *Annual Review of Immunology* 23(1):901-44.

Tissières, Pierre. 2009. « Rôle et Régulation de MD-2, La Protéine Réceptrice de l'endotoxine Bactérienne ».

## U

Ulevitch, Richard J., et Peter S. Tobias. 1999. « Recognition of Gram-Negative Bacteria and Endotoxin by the Innate Immune System ». *Current Opinion in Immunology* 11(1):19-22.

## V

van der Mark, Vincent A., Mohammed Ghiboub, Casper Marsman, Jing Zhao, Remco van Dijk, Johan K. Hiralall, Kam S. Ho-Mok, Zoë Castricum, Wouter J. de Jonge, Ronald P. J. Oude Elferink, et Coen C. Paulusma. 2017. « Phospholipid Flippases Attenuate LPS-Induced TLR4 Signaling by Mediating Endocytic Retrieval of Toll-like Receptor 4 ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 74(4):715-30.

## W

Waters, Daniel L. E., et Frances M. Shapter. 2014. « The Polymerase Chain Reaction (PCR): General Methods ». P. 65-75 in *Cereal Genomics*. Vol. 1099, *Methods in Molecular Biology*, édité par R. J. Henry et A. Furtado. Totowa, NJ: Humana Press.

West, A. Phillip, Igor E. Brodsky, Christoph Rahner, Dong Kyun Woo, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, Matthew C. Walsh, Yongwon Choi, Gerald S. Shadel, et Sankar Ghosh. 2011. « TLR Signalling Augments Macrophage Bactericidal Activity through Mitochondrial ROS ». *Nature* 472(7344):476-80.

West, T. Eoin, Robert K. Ernst, Malinka J. Jansson-Hutson, et Shawn J. Skerrett. 2008a. « Activation of Toll-like Receptors by Burkholderia Pseudomallei ». *BMC Immunology* 9(1):46.

## Z

Zhang, Ling, et Cheng-Cai Wang. 2014. « Inflammatory Response of Macrophages in Infection ». *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International* 13(2):138-52.