

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

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

Département de Biologie

Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et d'Immunologie W04144100

MEMOIRE

Présenté par

KHIAR Oussama

En vue de l'obtention du
Diplôme de MASTER

En Immunologie

Thème

Conception des amorces du gène *TNF- α* exprimé par le macrophage classiquement activé M1 au cours des infections

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

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

Année universitaire 2019/2020

Résumé

Introduction : L'infection est l'invasion de l'organisme par des agents étrangers. Les macrophages sont des acteurs de l'immunité innée et considérés comme la première ligne de défense contre les infections. Ces cellules éliminent l'infection par une inflammation dans laquelle, elles phagocytent les microbes ou par la sécrétion de plusieurs types de cytokines pro-inflammatoires, notamment le $TNF-\alpha$. L'étude de l'expression du gène qui code cette protéine offrira des possibilités de caractériser le type de macrophage impliqué dans la réponse anti-infectieuse.

Objectif : L'objectif de notre travail est de concevoir des amorces du gène $TNF-\alpha$ exprimé par les macrophages pro-inflammatoires (M1) au cours des infections.

Matériel et méthodes : La conception des amorces pour le gène $TNF-\alpha$ a été effectuée en utilisant l'outil Primer-Blast du site « www.ncbi.nih.gov ». Cet outil nous a permis de donner plusieurs paires d'amorces dont la plus fiable qui répond aux critères de choix de bonnes amorces a été choisie puis vérifiée par la suite par *In-Silico* PCR.

Résultats : A cause des produits aspécifiques supérieurs à 1000 paires de bases, la seconde paire des amorces a été choisie. Cette paire répond également à tous les critères de bonnes amorces.

Conclusion : le choix d'une bonne paire d'amorces participe fortement à la réussite de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) afin d'amplifier correctement le gène $TNF-\alpha$ et étudier son rôle dans l'immunité anti-infectieuse.

Mots clés : Infections, Macrophage, $TNF-\alpha$, PCR, amorces.

Abstract

Background: Infection is the body invasion by foreign agents. Macrophages are agents of innate immunity and they are considered as the first line of defense against infections. These cells clear the infection through inflammation in which they phagocytose microbes or through the secretion of several types of pro-inflammatory cytokines, including TNF-alpha. The study of the expression of the gene which encodes this protein will offer possibilities to characterize the type of macrophage involved in the anti-infectious response.

Objective: The objective of our work is to design primers for the *TNF- α* gene expressed by pro-inflammatory macrophages (M1) during infections.

Material and methods: The design of the primers for the *TNF- α* gene was done using the Primer-Blast tool from "www.ncbi.nih.gov". This tool allowed us to give several pairs of primers, of which the most reliable which meets the criteria for choosing good primers was chosen and then verified by In-Silico PCR.

Results: Because of the non-specific products greater than 1000 base pairs, the second pair of primers was chosen. This pair also meets all the criteria for good primers.

Conclusions: The choice of the right pair of primers is strongly involved in the success of the polymerase chain reaction (PCR) in order to correctly amplify the *TNF- α* gene and study its role in anti-infectious immunity.

Keywords: Infections, Macrophage, TNF- α , PCR, primers.

ملخص

المقدمة: العدوى هي غزو الجسم من قبل عوامل أجنبية. البلاعم هي عوامل المناعة الفطرية وهي خط الدفاع الأول ضد العدوى، تعمل هذه الخلايا على إزالة العدوى من خلال الالتهاب الذي يتسبب في حدوث بلعمة الميكروبات أو من خلال $TNF-\alpha$ إفراز عدة أنواع من السيتوكينات المؤيدة للالتهابات ، بما في. توفر دراسة التعبير عن الجين الذي يشفر هذا البروتين إمكانات لتوصيف نوع البلاعم المشاركة في الاستجابة المضادة للعدوى.

الهدف: الهدف من عملنا هو تصميم البادئات لجين $TNF-\alpha$ المعبر عنها بواسطة البلاعم المؤيدة للالتهابات (M1) أثناء العدوى.

المواد والطرق: تم تصميم البادئات لجين $TNF-\alpha$ باستخدام أداة Primer Blast من الموقع "www.ncbi.nih.gov". سمحت لنا هذه الأداة بالتحصل على عدة أزواج من البادئات، تم اختيار أكثرها موثوقية والذي يلي كل المعايير حيث تم التحقق منها في In-Silico PCR.

النتائج: بسبب المنتجات غير المحددة التي تزيد عن 1000 زوج أساسي ، تم اختيار الزوج المثالي من البادئات. يفي هذا الزوج. أيضاً بجميع معايير البادئات الجيدة

الخلاصة: إن اختيار الزوج المناسب من البادئات له دور كبير في نجاح تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) من أجل تضخيم جين $TNF-\alpha$ بشكل صحيح ودراسة دوره في المناعة المضادة للعدوى.

الكلمات المفتاحية: الالتهابات، الضامة، $TNF-\alpha$ ، PCR، البادئات.

Avant-propos

Je ne saurais commencer sans remercier tout d'abord Allah, le tout puissant de m'avoir accordé paix, santé, sérénité et surtout le courage pour pouvoir réaliser ce travail.

Mes sincères remerciements vont tout d'abord au Professeur Mourad Aribi, Directeur du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et d'Immunologie (biomolime), faculté des Sciences de la Nature et de la vie et Sciences de la Terre et de l'Univers. Université de Tlemcen.

Je tiens également à remercier chaleureusement Mme Wafa Nouari, Maître de Conférences classe B, Laboratoire Biomolim, Université de Tlemcen, pour son encadrement, ses précieux conseils, sa disponibilité et les encouragements qui m'ont permis de réaliser ce travail.

Je voudrais remercier énormément les membres du Jury qui ont accepté d'examiner mon travail.

Mes vifs remerciements s'adressent également à tous mes enseignants durant mon cursus universitaire et aussi à toute l'équipe du Laboratoire Biomolim.

Je dédie ce travail à toutes les personnes qui me sont chères, et tout particulièrement

Mes Parents, Mon frère Mohammed qui est mon idole et qui m'a soutenu depuis l'enfance, Ma sœur Fatna qui était et qu'elle sera toujours ma deuxième maman et mon ami fidèle Abd El Wadoud, Sans oublier les autres membres de la famille.

Mes chers amis : Amin Lagha, Meriem Habri, Sarra Benziani et Cyrine Dib.

Je tiens aussi à présenter mes dédicaces à Walide Sefraoui, Oussama Youbi, Krime Chaif, Oussama Sour, Abdelhamid Mokadem, Youcef Smaine.

Et Toutes les personnes qui m'ont aidé...

Table des matières

RÉSUMÉ	II
ABSTRACT	III
RÉSUMÉ EN ARABE.....	IV
AVANT-PROPOS	V
TABLE DES MATIÈRES	IV
LISTE DES FIGURES	IIX
LISTE DES TABLEAUX.....	IX
LISTE D'ABRÉVIATIONS	X
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1. REVU DE LA LITTÉRATURE.....	3
1.1.LES INFECTIONS	3
1.1.1. DÉFINITION	3
1.1.2. TYPES	3
1.1.2.1. Infections virales	3
1.1.2.2. Infections bactériennes	4
1.1.2.3. Infections parasitaires	5
1.1.2.4. Infections fongiques	5
1.1.3.RÉPONSES IMMUNITAIRES CONTRE LES INFECTIONS.....	5
1.2.MACROPHAGE.....	6
1.2.1. DÉFINITION	6
1.2.2. ORIGINE	6
1.2.3. PHÉNOTYPES.....	7
1.2.3.1. Macrophages M1	7
1.2.3.2. Macrophages M2	7
1.3. FACTEUR DE NÉCROSE TUMORALE α	8
1.3.1. DÉFINITION	8
1.3.2. GÈNE <i>TNF-α</i>	10
1.3.3. LA PROTÉINE <i>TNF-α</i>	10
1.3.4. STRUCTURES DE LA PROTÉINE <i>TNF-α</i>	10
1.3.5. SIGNALISATION	11
1.3.6. POLYMORPHISME.....	12
1.3.7. RÔLES.....	13
1.3.7.1. <i>TNF-α</i> et maladies auto-immunes	13
1.3.7.2. <i>TNF-α</i> et allergie	13
1.3.7.3. <i>TNF-α</i> et cancer.....	14
1.3.7.4. <i>TNF-α</i> et maladies infectieuses	14
1.3.8. <i>TNFα</i> , MACROPHAGE M1 ET L'IMMUNITÉ ANTI-INFECTIEUSE	14
1.4. PCR	16
1.4.1. DÉFINITION	16
1.4.2. ACTEURS DE LA PCR.....	16

1.4.2.1. L'ADN.....	16
1.4.2.2. Les amorces	16
1.4.2.3. Taq polymérase :	16
1.4.2.4. Les nucléotides	17
1.4.3. LES ÉTAPES DE LA PCR	17
1.4.4. TYPES DE LA PCR	18
1.4.4.1. PCR qualitative	18
1.4.4.2. PCR quantitative	18
1.4.5. UTILISATION DE PCR	18
1.5. PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS.....	19
1.5.1. PROBLÉMATIQUE	19
1.5.2. OBJECTIF	19
1.5.3. BUT.....	19
CHAPITRE 2. MATÉRIELS ET MÉTHODES	20
2.1. CONCEPTION D'AMORCES.....	20
2.2. SÉLECTIONS D'AMORCES	20
2.2.1. LA LONGUEUR DE L'AMORCE.....	20
2.2.2. TEMPÉRATURES DE FUSION.....	20
2.2.3. LA SPÉCIFICITÉ	20
2.2.4. LA COMPLÉMENTARITÉ.....	21
2.2.5. TENEUR EN GC	21
2.2.6. LA SÉQUENCE À L'EXTRÉMITÉ 3'	21
2.3. LA SÉQUENCE DU GÈNE <i>TNF-α</i>.....	21
2.4. L'OUTIL PRIMER-BLAST	22
2.5. CARACTÉRISTIQUES D'UNE BONNE AMORCE.....	25
2.6. IN-SILICO PCR.....	25
CHAPITRE 3. RÉSULTATS.....	26
3.1. RÉSULTATS DU PRIMER BLAST	26
3.2. CONFIRMATION DES RÉSULTATS	28
CHAPITRE 4 . CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	29
CHAPITRE 5 . RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	30

Liste des figures

Figure 1.1.	Polarisation et fonction des sous populations des macrophages	08
Figure 1.2.	Localisation du gène <i>TNFα</i> sur le chromosome 6 humain	10
Figure 1.3.	Structure de la protéine TNF- α	11
Figure 1.4.	Voies de signalisation TNF- α	12
Figure 1.5.	Rôle central du TNF- α dans la réponse immunitaire cellulaire à une infection bactérienne (Mycobactérie tuberculoses)	15
Figure 1.6.	Étapes de LA PCR	18
Figure 2.1.	Base de données « Ensembl »	22
Figure 2.2.	La séquence encadrée du gène <i>TNF-α</i> (l'exon 1)	22
Figure 2.3.	Site NCBI	23
Figure 2.4.	L'outil Primer blast	23
Figure 2.5.	Analyse de la séquence d'intérêt par Primer blast	24
Figure 2.6.	L'obtention des résultats à travers le primer blast	24
Figure 2.7.	In-Silico PCR	25
Figure 3.1.	Les 10 paires d'amorces	26
Figure 3.2.	Caractéristiques de la paire d'amorces choisie	27
Figure 3.3.	Résultats de confirmation par In-silico PCR	28

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1.	Principales familles de virus humains à ADN et à ARN	04
Tableau 1.2.	La superfamille TNF	09
Tableau 3.1.	La comparaison entre les critères d'une bonne amorce et notre amorce	27

Liste des abréviations**A**

AA	Acide aminée
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARG	Arginase

C

CCL	Ligand de chimiokine à motif CC
CD	Cluster de differentiation
COX-2	Cycoxygénase-2
CXCL	Ligand de chimiokine à motif CXC

D

DAMP	Motifs moléculaires associés aux dégâts
DD	Domaine de mort
dNTPs	DésoxyNucléotides-Triphosphates

F

F	Forward primer
FADD	Protéine Fas associée au domaine de la mort
Foxp3	Fork Head box P3

I

IFN- γ	L'interféron-gamma
IKK	Facteur nucléaire de l'activateur du gène du polypeptide léger kappa dans l'inhibiteur des cellules B ($I\kappa\beta$) kinase
IL	Interleukine
iNOS	Inductible oxyde nitrique synthase

J

JNK	Kinase c-Jun N-terminale
-----	--------------------------

L

LPS	Lipopolysacharides
-----	--------------------

M

M1	Macrophage pro-inflammatoire
M2	Macrophage anti-inflammatoire
MAPK / AP-1	Protéine kinase activée par un mitogène / Protéine d'activation 1

MEKK	Protéine kinase kinase activée par un mitigèn
MKK	MAP kinase kinase
mTNF α	Protéine membranaire TNF- α
N	
NCBI	Centre national d'information de la biotechnologie
NF-kB	Facteur de transcription nucléaire-kB
P	
P38	Protéine 38
PAMP	Motifs moléculaires associés aux pathogènes
Pb	Paire de base
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PRRS	Virus du syndrome reproducteur e respiratoire porcin
R	
R	Reverse praimer
RIP	Protéine d'interaction avec le récepteur
RT-PCR	Réaction de polymérisation en chaîne par transcription inverse
ROS	Espèces d'oxygènes réactif
S	
STAT	L'activation du transducteur de signal et l'activateur de la transcription
sTNF α	Protéine soluble TNF- α
T	
TGF- β	Fateur de croissance transformant bêta
Th	Lymphocytes T auxiliaire
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale alpha
TNFSF	Super famille des ligands du TNF
TNRSF	Super famille des récepteurs du TNF
TRADD	Protéine du domaine DEATH associée au récepteur du facteur de nécrose tumorale de type 1
TRAF	Facteur associé au récepteur du TNF
Treg	Lymphocytes T régulatrices
V	
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

Introduction

L'infection est l'invasion des micro-organismes pathogènes (virus, parasites, bactéries et champignons) dans l'organisme par différentes voies (aériennes, digestives, cutanées et mucosales) (Lindahl & Grace 2015). Le système immunitaire sert à protéger l'hôte contre ces microbes en utilisant à la fois des réponses immunitaires innée et adaptative pour détecter et neutraliser les agents pathogènes (Weston 2010). Ces réponses se caractérisent par la capacité de mémoriser les infections précédentes (Nicholson 2016).

Les macrophages sont des cellules immunitaires d'origine sanguine. Ils jouent un rôle clé dans l'inflammation et la défense de l'hôte contre les agents pathogènes. Ils proviennent du sac vitellin et foie fœtale lors du développement embryonnaire ou de la transformation des monocytes. À l'aide de différents facteurs comme l'environnement cytokinique et l'expression des marqueurs de surface, les macrophages se polarisent vers un profil pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire dont chacune exerce des fonctions spécifiques (Shapouri-Moghaddam et al. 2018).

Le TNF- α est l'un des membres de super famille de TNF qui contiens 19 ligands et 29 récepteurs, (Ham et al. 2016). Son gène est situé dans la région de classe III du complexe majeur d'histocompatibilité sur le chromosome 6 entre les gènes HLA-DR et HLA-B. Cette cytokine pro inflammatoire est produite principalement par les monocytes, les neutrophiles, les macrophages, les NK et les lymphocyte T, il se fixe sur deux récepteurs incompatibles (TNFR1 et TNFR2) qui activent différentes voies conduisant à l'apoptose ou la survie cellulaire (El-Tahan et al. 2016)

Le TNF- α participe dans de nombreuses fonctions biologiques. Il permet l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion et la perméabilité des cellules endothéliales ce qui améliore la migration des leucocytes ver le site infectieux (Fernández-Ruiz & Aguado 2018). Il est important dans l'activation et la différenciation des macrophages, la libération des cytokines, le recrutement des lymphocytes et la formation des granulomes (Gardam et al. 2003). Néanmoins, certains agents infectieux peuvent échapper à la réponse immunitaire en modifiant la polarisation des macrophages (Atri et al. 2018)

La PCR est une technique d'amplification enzymatique qui permet à partir d'un petit fragment d'ADN, d'obtenir un grand nombre des copies identiques de ce même fragment. Elle nécessite des acteurs suivants pour être réalisée : ADN, les amorces,

Introduction

Taq polymérase et les nucléotides. Cette technique comporte trois étapes : la dénaturation, l'hybridation et l'élongation dont chacune d'elles a une température spécifique. La PCR est largement utilisée en biologie pour détecter le gène responsable aux maladies (Kadri 2020).

L'objectif de notre travail est de Concevoir des amorces spécifiques au gène *TNF- α* exprimé par le macrophage M1 au cours des infections.

Chapitre 1. Revue de la littérature

1. Les infections

1.1. Définition

L'infection peut être définie par l'invasion des micro-organismes pathogènes comme les virus, les parasites, les bactéries et les champignons. Ces agents pénètrent dans l'organisme par différentes voies (aériennes, digestives, cutanées et mucosales) (Lindahl & Grace 2015). Cette pathologie est considérée comme l'un des premières causes de mortalité dans le monde. Elle est plus courante dans les pays sous-développés où la pauvreté, la mauvaise hygiène et d'autres facteurs de risque facilitent sa propagation (Saizonou Et *al.* 2014).

1.2. Types

1.2.1. Infections virales

Les virus sont des particules infectieuses qui représentent la population biologique la plus abondante dans notre vie (dix fois plus diverse à celle des bactéries). Ils ne peuvent se répliquer qu'en par pénétration dans la cellule de l'hôte qui peut être une bactérie, une cellule animale ou végétale pour continuer leur cycle évolutif et produire des nouvelles particules infectieuses (Forterre 2010).

La cellule hôte met des stratégies pour détruire ce pathogène mais le point fort du virus qu'il s'adapte aux effets de défense de l'hôte. Dans ce sens, plusieurs virus conduisent des infections aiguës dans l'organisme puis ils sont détruits par le système immunitaire, mais d'autre type de virus causent des infections persistantes (infection chronique ou latente) difficiles à éliminer par les réponses du système immunitaire (Knipe Et *al.* 2017; López Et *al.* 2019).

De plus, chaque virus a un type de cellule spécifique. Avant sa pénétration, il se fixe sur des récepteurs spécifiques à la surface des cellules cibles dont la sensibilité cellulaire à l'infection virale est déterminée par la présence de ces récepteurs ou d'autres cofacteurs. A nos jours de nombreux virus ont été découverts (Tableau 1.1) (Agut 2008; Schmid Et *al.* 2014).

Tableau 1.1. Principales familles de virus humains à ADN et à ARN (Agut 2008).

Virus à ADN		Virus à ARN	
Enveloppés	Nus	Enveloppés	Nus
Cytomégalovirus	Adénovirus	Coronavirus	Poliovirus
Herpèsvirus simplex	Virus JC	Virus de l'hépatite C	Virus de l'hépatite E
Varicelle-zona	Papillomavirus H6	Virus Chikungunya	Virus de l'hépatite A
Virus de l'hépatite B	Papillomavirus H8	Virus de rubéole	Astrovirus humain
Virus de l'orfi	Virus B19	Virus de la rage	Virus Sapporo
Vaccin	Adénovirus-associé 2	Virus de la rougeole	Virus Norwalk
Virus Epstein-Barr	Virus BK	Virus des oreillons	Rhinovirus humain

1.2.2. Infections bactériennes

Les bactéries sont des micro-organismes vivants qui survivent dans tous les milieux en formant une communauté complexe qui s'appelle biofilm et en adhérant entre eux à des différentes surfaces (O'Toole Et *al.* 2000). Les bactéries représentent 38% des agents provoquant des cas pathologiques humains ainsi qu'environ 30% des particules pathogènes qui se manifestent chez l'homme (Gulliford Et *al.* 2020).

Les bactéries se transmettent par diverses voies, la plus souvent à travers la paroi intestinale vers la circulation systémique et les ganglions lymphatiques mésentériques. Elles peuvent infecter plusieurs organes dans l'organisme (infection bactérienne de système cardiovasculaire, infection du système nerveuse, infection

rénale, arthrite septique/septicémie, abcès pulmonaire/ empyème et infection résistante/clostridium difficile et autre)(Gulliford Et *al.* 2020).

On outre, la grande capacité de la résistance aux antibiotiques est l'un des phénomènes les plus inquiétants chez les bactéries. Bien que ces dernières évoluent continuellement avec des mutations, elles ont des moyens de propager le matériel génétique latéralement entre les espèces en échangeant des compartiments intérieurs (plasmides ou des intégrons) ce qui considéré comme un moyen efficace de gérer diverses conditions environnementales défavorables dans la nature (Lindahl & Grace 2015).

1.2.3. Infections parasitaires

Les parasites sont considérés comme des organismes vivants de grande taille qui prennent à d'autres espèces un habitat pour eux. L'existence de ces agents pathogènes chez l'être humain peut provoquer plusieurs maladies. Les parasites les plus connus pour leur capacité à induire ces maladies sont les helminthes et les protozoaires, dont la transmission à l'hôte se fait généralement par une mauvaise hygiène. Comme les bactéries, les parasites eux-mêmes ont la capacité de résister contre plusieurs médicaments, cette caractéristique leur permet de s'échapper et se multiplier dans l'organisme(Lukeš Et *al.* 2014).

1.2.4. Infections fongiques

Les infections fongiques sont également connues sous le nom de mycoses. Elles peuvent être causées par différentes classes des champignons qui utilisent la peau, les ongles et les muqueuses comme refuge pour vivre. Seulement 300 espèces des champignons parmi 1,5 millions sont capables d'induire une pathologie chez l'hôte. Pour que ces infections puissent provoquer des dommages chez les personnes immunocompétentes, elles doivent être présentes en grandes quantités ou contenir des champignons particulièrement virulents. Néanmoins, des champignons moins virulents sont souvent responsables d'infection en cas d'immunodéficience locale ou générale (S. Pontier 2007). En outre, plusieurs facteurs conduisent à la propagation de cette pathologie tels que l'obésité, le diabète, une mauvaise hygiène et certains traitement inappropriés (Akoua Et *al.* 2019).

1.3. Réponses immunitaires contre les infections

Le système immunitaire humain à deux niveaux d'immunité, innée et adaptative, grâce à l'immunité innée, le corps humain se protège contre les matières étrangères perçues comme nocives. Cette première ligne de défense comprend des

Chapitre 1. Revue de la littérature

barrières extérieures comme la peau, les muqueuses, les protéines antimicrobiennes et les globules blancs (macrophage, neutrophile, basophile, et éosinophile)(Mandell Et *al.* 2010).

Contrairement à l'immunité innée, l'immunité adaptative construit une réponse ciblée contre un pathogène spécifique. Il peut être humoral par la production des anticorps via les lymphocytes B ou cellulaire par les lymphocytes T. Il existe une collaboration entre les lymphocytes T helper (Th2) qui expriment des molécules de cluster de différenciation (CD 4) permettent d'aider les lymphocytes B à générer des réponses d'anticorps en sécrétant des cytokines qui stimulent également d'autres cellules(Weston 2010).

La réponse immunitaire contre les infections se caractérise par la capacité de mémoriser les infections précédentes. Cette caractéristique est considérée comme l'un des avantages les plus importants dont elle permet au système immunitaire à la fois de protéger les individus contre la réinfection et de limiter la propagation de l'infection dans une communauté (Nicholson 2016).

2. Macrophage

2.1. Définition

Les macrophages sont une population des cellules qui fait partir des leucocytes. Ils sont les plus importantes et les plus nombreuses dans le corps (Williams Et *al.* 2018). Ces cellules ont une grande diversité anatomique et fonctionnelle grâce à leur emplacement dans tous les tissus (Wynn Et *al.* 2013). En outre, les macrophages jouent un rôle crucial au sein de l'inflammation et la défense de l'hôte en répondant à des agents nocifs qui pénètrent dans l'organisme. L'une des principales caractéristiques des macrophages est leur capacité à reconnaître, à absorber et à détruire les substances pathogènes internes et externes au cours d'une réponse aux signaux inflammatoires par la phagocytose (Chen Et *al.* 2020).

2.2. Origine

Les macrophages sont des cellules à plusieurs origines. il y a les macrophages résidents tissulaires provenant du sac vitellin ou du foie fœtal et les macrophages dérivés de monocytes par l'infiltration de la moelle osseuse (Gordon & Martinez 2010), dont toutes ces cellules apparaissent à différentes stades du développement et à l'âge adulte (Epelman Et *al.* 2014). Des études récentes suggèrent que la majorité des macrophages tissulaires sontensemencés avant la naissance, provenant du sac vitellin au cours de développement fœtal. Ils sont maintenus indépendamment aux

monocytes dont, ils ont la capacité d'auto-renouvellement (Shapouri-Moghaddam Et *al.* 2018).

2.3. Phénotypes

Les macrophages expriment une plasticité remarquable qui permet leur diversité dans les tissus (chaque population des macrophages a un tissu spécifique) ; dans laquelle ses diverses populations peuvent être différenciées et développées en répondants à des signaux micro-environnementaux (Sica & Mantovani 2012).

Les chercheurs ont décrit plusieurs classes des macrophages chez l'homme selon la production des facteurs spécifiques, l'expression des marqueurs de surfaces et l'activité biologique de ces cellules. De plus, l'environnement cytokinique est l'un des principaux facteurs qui oriente la polarisation de ces cellules vers deux types : des macrophages classiquement activés ou pro-inflammatoires (M1) et des macrophages alternativement activés ou anti-inflammatoires (M2) (Murray 2017).

2.3.1. Macrophages M1

Les macrophages se polarisent vers un profil M1 à l'aide de la reconnaissance des lipopolysaccharides (LPS) bactériens ou à travers des cytokines produites par les lymphocytes T helper 1 (Th1), comme le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) et l'interféron-gamma (IFN- γ) (Figure 1.1). Ces macrophages sont caractérisés par une forte présentation antigénique et une sécrétion élevée des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'interleukine-6 (IL-6), l'IL-12, l'IL-23, l'IL-1 α , l'IL-1 β et la cyclooxygénase-2 (COX-2) (Bashir Et *al.* 2016; Biswas Et *al.* 2012). Ces caractéristiques jouent un rôle important dans l'élimination des agents étrangers (pathogènes) lors d'une infection. En conséquence, les macrophages M1 ont une forte activité antimicrobienne et anti-tumorale. Ils interviennent dans les dommages tissulaires causés par les espèces d'oxygènes réactif (ROS), la guérison de plaies et la régénération des tissus (Cassetta Et *al.* 2011; Wang Et *al.* 2014).

2.3.2. Macrophages M2

Les macrophages sont généralement orientés vers le profil M2 grâce aux cytokines Th2 (IL-4, et IL-13) via l'activation du transducteur de signal et l'activateur de la transcription 6 (STAT6) (Figure 1.1). En outre, IL-10 et IL-33 peuvent effectuer la même fonction que les cytokines Th2 via l'activation de différentes voies comme STAT3 et la régulation à la hausse de la voie d'arginase, respectivement (Wang Et *al.* 2014). Le profil anti-inflammatoire présenté par les M2 est caractérisé par une production remarquable d'IL-10 et du facteur de croissance transformant bêta (TGF- β)

et une production négligeable d'IL-12. De plus, ces cellules jouent des multiples fonctions dans l'organisme, comme la phagocytose, la réparation et la cicatrisation tissulaire, la récupération des cellules apoptotiques, l'atténuation et l'inhibition de l'inflammation (Shapouri-Moghaddam Et *al.* 2018; Wang Et *al.* 2019).

Les macrophages M2 se divisent en quatre sous populations : M2a, M2b, M2c, et M2d.

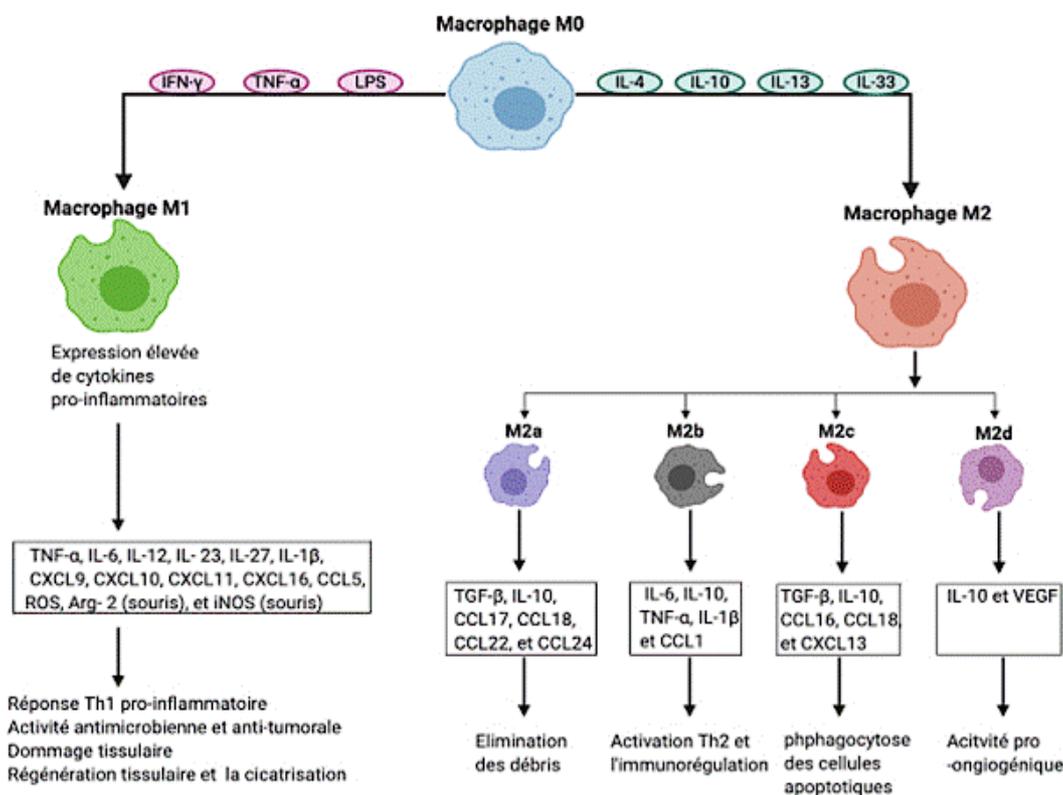


Figure 1.1. Polarisation et fonction des sous populations des macrophages (Shapouri-Moghaddam Et *al.* 2018; Wang Et *al.* 2019). IL : interleukine, IFN- γ : interférent- γ , LPS : lipopolysaccharide, TNF : Facteur de nécrose tumorale, TGF : facteur de croissance transformant, CXCL : ligand de chimiokine à motif CXC, CCL : ligand de chimiokine à motif CC, ROS : espèces d'oxygènes réactif, ARG : arginase, iNOS : inductible oxyde nitrique synthase, VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, Th : lymphocyte auxiliaire, M1 : macrophage-pro inflammatoire, M2 : macrophage anti-inflammatoire.

3. Facteur de nécrose tumorale α

3.1. Définition

Le TNF- α a été reconnu en 1976 comme une molécule inductible induite par les endotoxines provoquant la nécrose des cellules tumorales (Fernández-Ruiz & Aguado 2018). Le TNF- α est l'un des membres de la famille du TNF (TNFSF) composée de 19 ligands structurellement apparentés qui peuvent être associés à un ou plusieurs des 29 membres du récepteur de TNF (TNRSF) (Tableau 1.2). Ces récepteurs se

Chapitre 1. Revue de la littérature

distinguent par la présence de 1 à 6 domaines riches en cystéine dans leur région extracellulaire responsables de la liaison de leurs ligands respectifs. De plus, ces récepteurs régulent l'immunité, l'inflammation et la survie cellulaire (Ham Et *al.* 2016).

Tableau 1.2. La superfamille TNF (Zelová & Hošek 2013)

Famille de TNF (ligand)	Numéro de CD	Nom de leurs récepteurs
TNF- α , LT α	CD120a	TNFR1
TNF- α , LT α	CD120b	TNFR2
TRAIL	CD261	DR4
TRAIL	CD262	DR5
BAFF	CD268	BAFFR
RANKL	CD265	ODFR
BAFF, APRIL	CD267	TACI
FasL	CD95	FasR
LT $\alpha\beta$, LIGHT	CD18	LT β R
BTLA, LIGHT, LT α	CD270	TR2
N-APP	CD358	DR6
OX40L	CD134	OX40
CD27L	CD27	Tp55

CD30L	CD30	Ki-1 antigène
TRAIL	CD263	DcR1
TRAIL	CD264	DcR2
CD40L	CD40	—

3.2. Gène *TNF-α*

Le gène *TNF-α* se trouve au niveau de l'antigène leucocytaire humain (HLA) III du séisme chromosome, entre HLA-DR et HLA-B (Zhang Et *al.* 2017). Il possède 4 exons qui contiennent 2 762 paires de bases sur leur emplacement cytogénétique : 6p21.33 ; cela est le bras court (p) au niveau du chromosome 6 à la position 21.33 (Chen 2011) (Figure 1.2)

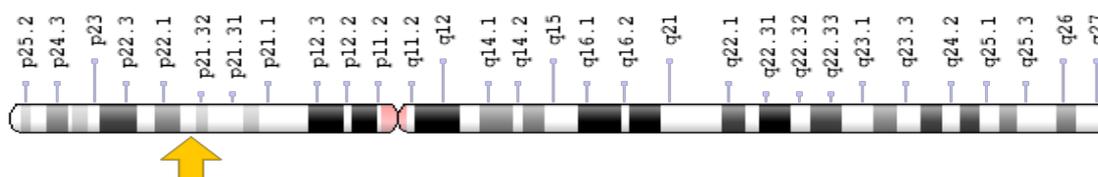


Figure 1.2. Localisation du gène *TNF-α* sur le chromosome 6 humain (d'après Genetics Home Reference).

3.3. La protéine *TNF-α*

Cette protéine est considérée comme une cytokine pro-inflammatoire (Saha & Smith 2018), qui a été découverte au sein des années 1970 comme un médiateur sérique qui intervient dans l'immunité innée (Josephs Et *al.* 2018). Ce facteur est exprimé dans une large gamme de cellules, notamment les monocytes, les neutrophiles, les macrophages mononucléaires, les cellules NK et les lymphocytes T (Sacco Et *al.* 2020).

3.4. Structures de la protéine *TNF-α*

Le *TNF-α* est un homotrimer exprimé comme une protéine membranaire de masse moléculaire de 27kDa (233 acides aminés) appelée m*TNFα* qui a été clivée protéolytiquement par l'enzyme métalloprotéase (TACE) pour donner une forme

soluble (sTNF α) de 17KDa. Ce produit a une structure contenant deux feuilles β plissées antiparallèles et des brins β antiparallèles regroupés entre eux pour former une structure β en gelée (Figure 1.3) (Parameswaran & Patial 2010).



Figure 1.3. Structure de la protéine TNF- α (Zhang Et *al.* 2017).

3.5. Signalisation

Le TNF- α se lie sur deux récepteurs non identiques produits par différentes cellules. L'une est le TNFR1 (TNFRSF1A, p55) qui se présente dans presque toutes les cellules du système immunitaire et l'autre est le TNFR2 (TNFRSF1B, p75) détecté seulement dans les sous ensemble de cellule T, les cellules neuronales, les cellules souches mésenchymateuses, les thymocytes, les cellules endothéliales et les cellules myocytes (Faustman & Davis 2013; Speeckaert Et *al.* 2012).

Le TNFR1 est une protéine transmembranaire qui fait intervenir 434 acides aminés (AA). Il contient quatre domaines riches en cystéine dans la région extracellulaire et un domaine de mort (DD) dans la partie intracellulaire qui lie le domaine de la mort associé au TNFR (TRADD) et le domaine de la mort associé au FAS (FADD) favorisant la mort cellulaire. En parallèle, Le TNFR2 est un récepteur transmembranaire composé de 439 AA. Il contient un domaine extracellulaire, une région transmembranaire et un domaine intracellulaire (Cabal-Hierro & Lazo 2012).

Contrairement au TNFR1, le TNFR2 est dépourvu de DD et contient des fonctions liées à la survie cellulaire par l'activation du facteur de transcription nucléaire- κ B (NF- κ B) (Rossi Et *al.* 2019). La figure 1.4 représente les voies de signalisation pour

les récepteurs de TNF- α (TNFR1 et TNFR2) qui utilisent différent paramètre (voie TRADD et voie TRAF2) conduisant l'apoptose ou la survie cellulaire.

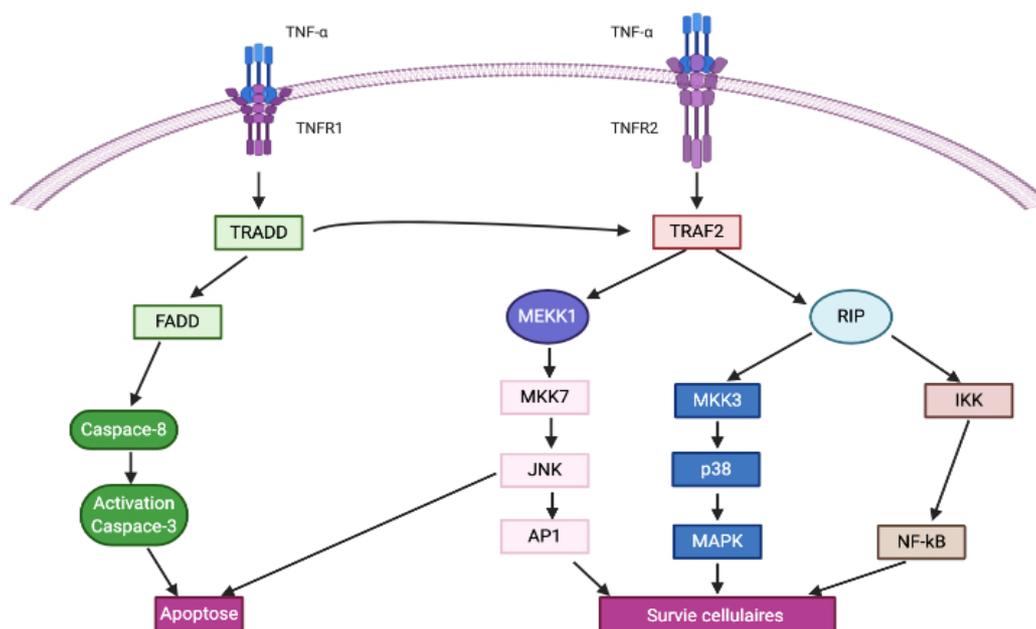


Figure 1.4. Voies de signalisation TNF- α (Ham Et al. 2016). TNF : Facteur de nécrose tumorale, TNFR : récepteur de facteur de nécrose tumorale, TRAF : facteur associé au récepteur du TNF, TRADD : La protéine du domaine DEATH associée au récepteur du facteur de nécrose tumorale de type 1, FADD : Protéine Fas associée au domaine de la mort, IKK : Facteur nucléaire de l'activateur du gène du polypeptide léger kappa dans l'inhibiteur des cellules B (I κ B) kinase, JNK : kinase c-Jun N-terminale, MAPK / AP-1 : Protéine kinase activée par un mitogène / Protéine d'activation 1, NF- κ B : Stimulateur du facteur nucléaire kappa-chaîne légère des cellules B activées, P38 : protéine 38, RIP : protéine d'interaction avec le récepteur, MAPK : protéine activée par un mitogène Kinase, MKK : MAP kinase, MEKK : protéine kinase kinase activée par un mitogène.

La fixation du TNF- α sur le premier récepteur TNFR1 permet le recrutement de DD associé au TRADD qui va se fixer sur le deuxième DD associée au FADD et la caspase-8 permettant l'activation de la caspase-3 et à la mort cellulaire (l'apoptose)(Cabal-Hierro & Lazo 2012). Paradoxalement, le TNFR2 se lie au TRAF2 conduisant au recrutement d'une protéine associée au récepteur (RIP) permettant l'activation de P38-MAPK par l'intervention de la voie MKK3 et aussi l'inhibition de complexe IKK qui conduit à l'activation de facteur de transcription NF- κ B. En parallèle, le ERK kinase kinase1/MAP (MEKK1) et la MKK7 conduisent à l'activation du facteur transrationnel AP-1. Ces trois vois subissent finalement l'inflammation et la survie cellulaire (Wajant & Siegmund 2019).

3.6. Polymorphisme

Les activités biologiques du gène TNF α et son emplacement dans le CMH expliquent la participation des polymorphismes localisés au niveau de ce gène à la

pathogénèse de plusieurs maladies auto-immunes et infectieuses, dont il a été noté que des altérations génétiques du locus TNF- α auraient contribué à une production plus élevée de TNF- α (El-Tahan Et *al.* 2016).

Par, rapport au site de départ de la transcription, le gène TNF α possède des nombreux polymorphismes à l'intérieur de son promoteur, -49 (G / A), -162 (G / A), -238 (G / A), -308 (G / A), -376 (G / A), -419 (G / C), - 851 (C / T), , -857 (C / A), -863 (C / A) et -1031 (T / C). En conséquence, le contrôle de l'expression du gène TNF- α se réalise par la présence de certains polymorphismes dans sa région promotrice et par divers facteurs nucléaires ou molécules de signalisation qui interagissent avec la région promotrice de gène TNF- α (El-Tahan Et *al.* 2016).

3.7. Rôles

Le TNF- α intervient dans des nombreuses fonctions biologiques qui participent à la défense de l'hôte vis-à-vis un agent pathogène. C'est le chef d'orchestre des cytokines impliquant d'autres interleukines telles que l'IL-8, l'IL-6 et l'IL-1. Cette cytokine permet aussi l'augmentant de l'expression des molécules d'adhésion et la perméabilité des cellules endothéliales ce qui améliore la migration des leucocytes en particulier les neutrophiles et les macrophages vers le site d'infection (Fernández-Ruiz & Aguado 2018).

3.7.1. TNF- α et maladies auto-immunes

Le TNF- α joue un rôle important dans la physiopathologie de nombreuses maladies auto-immunes ; grâce à l'expression de TNFR2 sur la plupart des lymphocytes T régulateurs (Treg). Il augmente l'expression de fork Head box P3 (Foxp3) et CD25 sur les Treg et exerce un effet immunosuppresseur. L'administration de TNF- α à faible dose permet de tuer les cellules T auto-réactives conduisant à une inversion des maladies auto-immunes telles que le diabète du type 1. En plus de son rôle immunosuppresseur, le TNF α est essentiel pour maintenir l'homéostasie cellulaire, la régénération tissulaire et la protection des tissus contre les dommages (Tseng Et *al.* 2018)

3.7.2. TNF- α et allergie

Le TNF- α a un rôle central dans la réaction immunitaire contre les allergènes. Il est produit par les cellules épithéliales sensibilisées, les mastocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. Il peut stimuler la réponse Th2 permettant l'augmentation de la sécrétion d'IL-4, IL-5 et IL-13 qui activent les éosinophiles, les mastocytes et les

basophiles. À l'aide de l'expression des molécules d'adhésion, le TNF- α est essentiel pour le recrutement de ces cellules au site d'inflammation allergique (Lee Et *al.* 2016 ; Choi Et *al.* 2012) . Néanmoins, une grande quantité des TNF- α dans l'organisme en cas d'allergies peut contribuer au dysfonctionnement de la barrière épithéliale ainsi que peut augmenter la perméabilité endothéliale aux allergènes (Hardyman Et *al.* 2013).

3.7.3. TNF- α et cancer

TNF- α a un double rôle dans le cancer. Il peut à la fois participer comme un promoteur pro-tumoral (favorisant la survie et la prolifération de cellules malignes par l'activation des voies NF- κ B) ou anti-tumorale (induisant la mort des cellules cancéreuses par l'activation de longue durée de la voie JNK)(Lu Et *al.* 2014).

L'administration locale aigue du TNF- α entraine des effets cytotoxiques dans les cellules tumorales. Par contre, l'expression persistante du TNF- α exerce un fort effet protecteur contre la progression de plusieurs cancers (Katanov Et *al.* 2015). Ce rôle de TNF- α dans le cancer dépend de sa concentration, la présence d'autres cytokines ou chimiokines ainsi que le type et la durée d'exposition du cancer (Lv Et *al.* 2015).

3.7.4. TNF- α et maladies infectieuses

Le TNF- α joue un rôle primordial dans la défense de l'organisme contre les agents infectieux en recrutant les cellules immunitaires vers le site infectieux (Kumar Et *al.* 2015). Il peut moduler la réplication des virus grâce à la signalisation TNFR (Kumar Et *al.* 2013) et inhiber la croissance de certaines bactéries intracellulaires telles que *Listeria monocytogenes*, mycobactéries et autres micro-organismes intracellulaires (Fernández-Ruiz & Aguado 2018).

3.8. TNF α , macrophage M1 et l'immunité anti-infectieuse

Le TNF- α est produit par différentes cellules immunitaires qui peut jouer diverses fonctions dans l'organisme (El-Tahan Et *al.* 2016). Il est capable d'orienter les macrophages vers un phénotype M1 en réponse aux infections exogènes (Cassetta Et *al.* 2011)

Des études montrent qu'en l'absence de TNF- α (dans les macrophages différenciateurs), les cellules suivent un programme de prolifération plutôt que de subir un programme de différenciation (Parameswaran & Patial 2010).

En cas d'une infection bactérienne Les macrophages expriment des récepteurs de type PRR pour identifier les molécules de dangers (DAMP) et les signaux pathogènes (PAMP)(Atri et al. 2018) (figure 1.5). Cette reconnaissance permet l'activation des macrophages avec une stimulation autocrine par le TNF- α ce qui induit la libération des cytokines et des chimiokines permettant l'attraction, la stimulation, la prolifération et le recrutement des lymphocytes B et T. Les lymphocytes T activés libèrent de IFN- γ qui entraîne une activation accrue des macrophages, une augmentation de la présentation antigénique, la mort intracellulaire des agents pathogènes, l'apoptose des macrophages et la formation des granulomes (Gardam Et al. 2003). La figure 1.5 représente la fonction du TNF- α au sein d'une infection bactérienne qui permet la libération des cytokines et chimiokines et l'activation des cellules immunitaire induisant à la fin la mort intracellulaire des agents infectieuses.

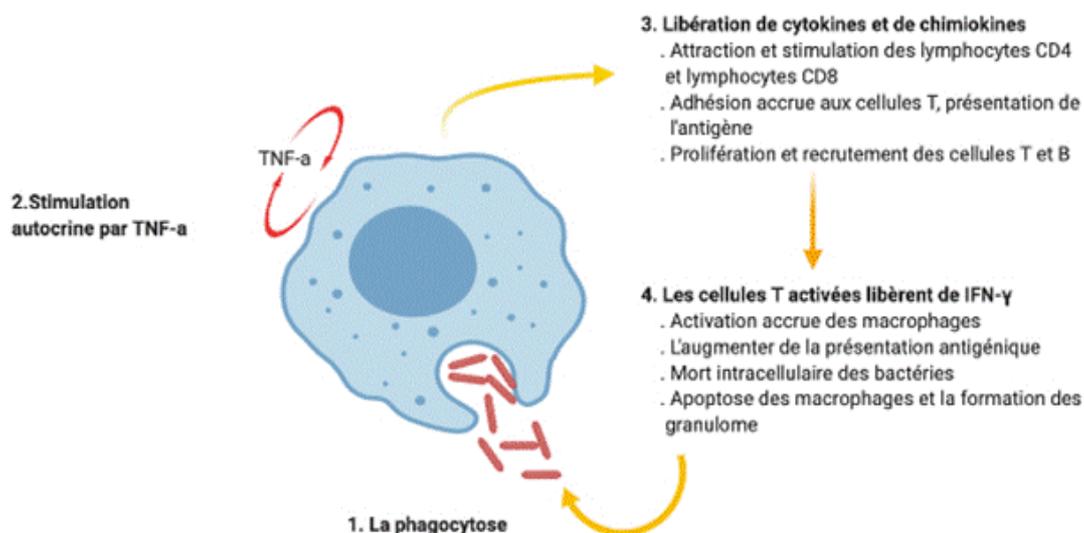


Figure 1.5. Rôle central du TNF- α dans la réponse immunitaire cellulaire à une infection bactérienne (*Mycobactérie tuberculosis*) (Gardam Et al. 2003).

Le TNF- α a une double fonction. D'un côté, une production locale de TNF- α est utile à l'état aigue car elle permet l'élévation de l'expression des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales. Cela aide les cellules immunitaires à migrer vers les sites d'infection en activant les phagocytes qui englobent les agents infectieux. D'autre part, une augmentation systématique ou prolongée des niveaux de TNF- α peut être nocive et capable de provoquer un choc toxique, dont la perfusion de TNF- α induit un syndrome de réponse inflammatoire systémique. Chez les animaux, l'injection de TNF- α entraîne un syndrome semblable au choc septique(El Gendy Et al. 2020).

De plus, il est bien connu que des agents pathogènes bactériens, viraux, parasitaires et fongiques ont développé des mécanismes pour échapper à la réponse immunitaire, dont ils empêchent la polarisation des macrophages vers un profil M1 en activant les macrophages M2 afin de réduire la réponse pro-inflammatoire (Atri Et *al.* 2018).

4. PCR

4.1. Définition

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) est une technique enzymatique créée par Mullis en 1983 et brevetée en 1985 (Garibyan & Avashia 2013). Elle est basée sur l'utilisation de l'enzyme ADN polymérase dont le principe est de générer une large quantité des copies d'un fragment d'ADN spécial à partir d'un extrait d'ADN. On peut dire que la PCR est une technique de purification ou de clonage puisqu'elle a la capacité d'amplifier des séquences nucléotidiques à partir des quantités infiniment petites d'extrait d'ADN. Actuellement, la PCR est une technique essentielle en biologie cellulaire et moléculaire. Elle a un avantage de réduire le temps de clonage acellulaire d'un fragment d'ADN (Kadri 2020).

4.2. Acteurs de la PCR

4.2.1. L'ADN

L'ADN est l'élément le plus important dans cette opération. C'est la source des fragments à amplifier (Touati Soumia 2013).

4.2.2. Les amorces

Il est important d'avoir au moins une paire d'oligonucléotides chimiquement synthétisée pour appliquer cette technique. Ces dernières doivent être complémentaires aux deux extrémités de la séquence d'intérêt à amplifier. Chaque amorce est conçue pour un but particulier ; l'une est pour reconnaître complémentaiement la séquence localisée en amont du fragment d'ADN du brin 5'-3' d'intérêt, l'autre est pour reconnaître, de la même manière, une séquence localisée en amont du brin complémentaire (3'-5') du même fragment d'ADN (Pelt-Verkuil Et *al.* 2008).

4.2.3. Taq polymérase

Le choix de l'utilisation d'une ADN polymérase (Taq polymérase) est effectué pour sa résistance remarquable à des températures élevées (d'environ 100°C), qui ont le pouvoir de dénaturer la plupart des protéines (Kadri 2020).

4.2.4. Les nucléotides

Ce sont des composants utilisés par l'enzyme citée au-dessus pour la synthèse des brins d'ADN complémentaires. Elles sont connues par les DésoxyNucléotides-Triphosphates (dNTPs)(Touati Soumia 2013).

4.3. Etapes de la PCR

La technique PCR se réalise en trois étapes de base dont les produits de chaque étape sont considérés comme une clé pour initier l'étape suivante (figure 1.6) (Pelt-Verkuil Et *al.* 2008).

La PCR s'effectue par un mélange d'extrait d'ADN, la Taq polymérase, les amorces et les quatre dNTPs dans des tubes puits placés dans un thermocycleur (Uhel Et *al.* 2019).

Tout d'abord, une déformation à haute température (94 ° C) sépare les deux brins d'ADN en détruisant les liaisons hydrogènes. Deuxièmement, l'hybridation par une température inférieure (40°C à 70°C) donne aux liaisons hydrogènes la capacité de se reformer et permet également l'hybridation des brins complémentaires. Troisièmement, l'élongation réalise par une température d'allongement (72°C) résumée dans la synthèse du brin complémentaire dont la Taq polymérase utilise les dNTPs présentes dans le mélange réactionnel pour effectuer cette opération (Kadri 2020).

La figure 1.6 représente les principales étapes de PCR à partir d'un petit fragment d'ADN pour obtenir un grand nombre des copies identique en utilisant les acteurs de ce processus.

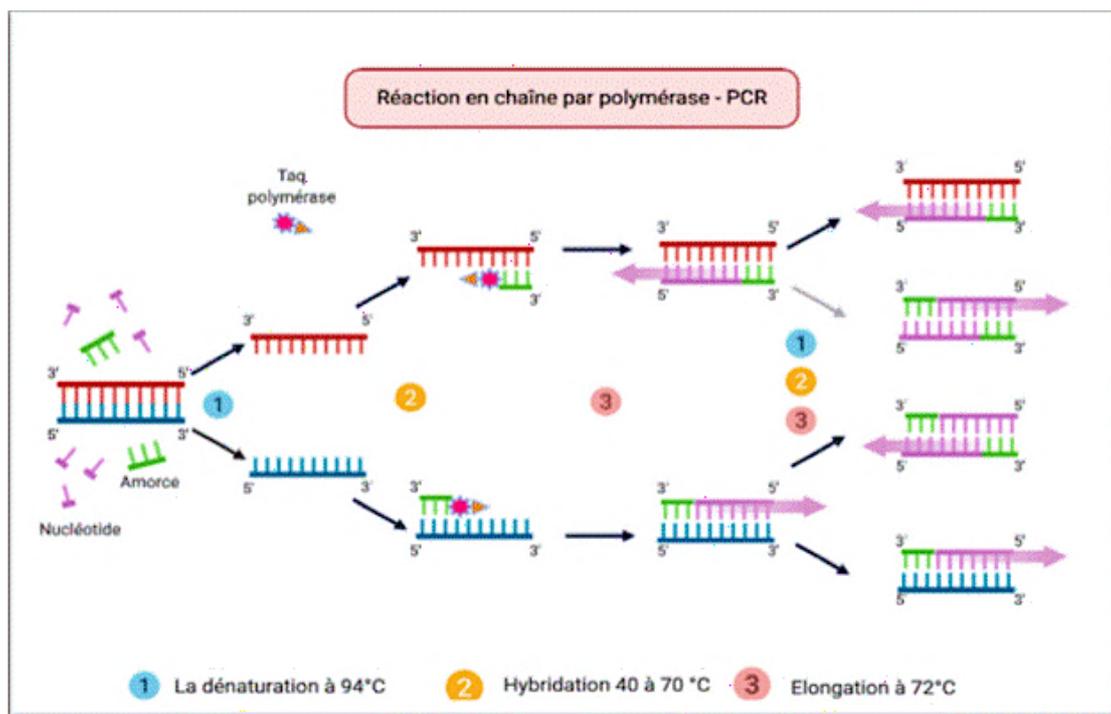


Figure 1.6. Étapes de la PCR (Ghannam & Varacallo 2020).

4.4. Types de la PCR

4.4.1. PCR qualitative

La PCR peut être utilisée pour plusieurs buts. Si elle est manipulée pour la détection de la présence ou bien l'absence d'un produit d'ADN spécifique, elle est nommée PCR qualitative (Garibyan & Avashia 2013).

4.4.2. PCR quantitative

Ce type a été développé au cours des années 80 pour le but de donner le niveau d'ADN ou d'ARN spécifique dans un échantillon biologique. Il se fait par la détection d'un signal fluorescent qui est généré de manière proportionnelle à l'amplification du produit PCR (Kadri 2020).

4.5. Utilisation de PCR

Le PCR est largement utilisé dans la détection des maladies génétiques et infectieuses, il permet l'amplification des gènes responsables des maladies génétiques, ce qui conduit à la détection de la nature, la position et la taille des mutations nuisibles, c'est un outil central dans le domaine de la paléogénétique, qui consiste à récupérer et analyser des séquences d'ADN d'organismes plus ou moins anciens (Kadri 2020). Cependant, cette technique ne peut être utilisée que pour

identifier l'absence ou la présence d'un agent pathogène ou gène connu (Garibyan & Avashia 2013).

5. Problématique et objectif

5.1. Problématique

Le système immunitaire est toujours en guerre vis-à-vis des agents infectieux qui envahissent l'organisme. De nombreuses infections ont été largement éliminées grâce aux macrophages. Cependant, certains agents infectieux peuvent développer des mécanismes pour échapper de système immunitaire et résister au processus de lyse cellulaire. Par ailleurs, le gène *TNF- α* joue un rôle crucial dans l'immunité anti-infectieuse, en raison de son effet direct sur la polarisation des macrophages vers un profile pro inflammatoire M1, ainsi que sur le recrutement d'autres cellules qui permettent l'irradiation de l'infection, ce qui fortement suggère l'association de gène *TNF- α* avec les M1 au sein d'une infection.

5.2. Objectif

Concevoir des amorces spécifiques au gène *TNF- α* exprimé par le macrophage M1 au cours des infections.

5.3. But

Montre la relation entre le gène *TNF- α* et le rôle du macrophage M1 dans l'immunité anti-infectieuse par les techniques de biologie moléculaire.

Chapitre 2. Matériel et méthodes

1. Conception d'amorces

La conception d'amorces est l'élément le plus important dans tout test PCR, dont les propriétés des amorces jouent un rôle majeur dans le contrôle de la spécificité, la sensibilité et l'efficacité de cette méthode. Une mauvaise conception est capable d'entraîner une précision réduite de la technique et empêcher son fonctionnement. (Bustin & Huggett 2017).

Pendant une conception d'amorces d'une région spécifique pour réaliser l'amplification d'ADN, il faut qu'une amorce soit orientée dans le sens 5'___ 3', alors que son brin d'amorce complémentaire est orientée dans l'autre sens 3'___ 5'(Albert & Fenyö 1990).

2. Sélection d'amorces

Lors de la sélection d'amorces, il y a plusieurs facteurs qui doivent être pris en considération pour réussir les expériences de PCR (Chuang et al. 2013). On cite ci-dessous les plus importants :

2.1. La longueur de l'amorce

Ce facteur est essentiel pour le succès de la PCR. Il a également une relation proportionnelle avec l'efficacité de l'hybridation dont, plus la longueur d'amorce est optimale plus l'amplification est parfaite (BELAID Nadia 2017, p.3).

Dans une expérience de PCR, la longueur optimale de l'amorce est de 16 à 28 nucléotides avec une différence de longueur qui ne dépasse pas 3 nucléotides entre l'amorce directe et l'amorce inverse (Wu et al. 2004).

2.2. Température de fusion

Ce paramètre est considéré comme la valeur la plus critique pour effectuer une PCR réussie. La température de fusion est généralement entre 50 et 62 °C avec une différence de température qui ne dépasse pas 5 °C (sachant que les amorces sont placées dans le même tube donc la différence est nulle)(Chuang et al. 2013).

2.3. La spécificité

Cette caractéristique garantit que l'amorce conçue soit capable de détecter une séquence spécifique, dans le but d'empêcher des résultats de PCR invalides.

Il existe multiples facteurs qui influencent la spécificité de la PCR, notamment la pureté de la séquence de l'amorce, la pureté de l'ADN matrice, la température de recuit et d'autres additifs, qui sont fréquemment compris dans le mélange de PCR (Zhong et al. 2016).

2.4. La complémentarité

Les amorces doivent n'avoir aucune homologie intra-amorces, ni inter-amorces. Il faut également éviter l'auto-recuit des amorces pour que celui-ci soit la cause de la formation d'une structure secondaire appelée épingle à cheveux. Pour cette condition, il faut vérifier les amorces directes et inverses individuellement afin de permettre l'hybridation des amorces à la séquence de matrice (Vallone & Butler 2004).

2.5. Teneur en GC

Ce paramètre est identifié comme une valeur en pourcentage dont son but est d'indiquer le rapport des nucléotides « G » et « C » qui apparaissent dans une amorce. Une proportion GC idéale d'une amorce est généralement entre 40 et 60% avec l'absence des poly-C et poly-G (Chuang et al. 2013)

2.6. La séquence à l'extrémité 3'

La présence des résidus GC met la position terminale 3' essentiel pour empêcher le désamorçage parce que la stabilité thermodynamique des bases GC est plus haute par rapport aux paires de bases AT (Tham & Moon 1996).

3. La séquence du gène *TNF- α*

La conception des amorces passe initialement par extraire la séquence du gène *TNF- α* à partir la base de données « Ensemble » via le site « [www. Ensembl .org](http://www.Ensembl.org) », cela est montré dans la figure 2.1.

The screenshot shows the Ensembl genome browser interface for the TNF gene (ENSG00000232810). The page includes a navigation menu on the left, a header with search and user options, and a main content area with gene details and a table of transcripts.

Gène: TNF ENSG00000232810

La description: facteur de nécrose tumorale [Source: Symbole HGNC; Acc: [HGNC:11892](#)]

Gene Synonymes: DIF, TNF-alpha, TNFA, TNFSF2

Emplacement: Chromosome 6: 31 575 565-31 578 336 brin avant.
GRCh38: CM000668.2

À propos de ce gène: Ce gène a 1 transcrit ([variante d'épissage](#)), 1 allèle de gène, [309 orthologues](#) , [8 paralogues](#) , est membre de [1 famille de protéines Ensembl](#) et est associé à [3 phénotypes](#) .

Nom	ID de transcription	bp	Protéine	Biotype	CCDS	UniProt	RefSeq Match	Drapeaux
TNF-208	ENST00000449264.3	1678	233aa	Codage des protéines	CCDS4702	P01375 Q9STB3	NM_000594.4	TSL:1 GENCODE basic APPRIS P1 M

Séquence balisée

Télécharger la séquence / BLAST cette séquence

Exons: Exons TNF. Tous les exons de cette région.

Figure 2.1. Base de données Ensembl

Après avoir identifié la séquence du gène *TNF- α* , on a copié toute la séquence puis l'a collé dans un document Word. Dans notre cas, on a choisi et encadré l'exon 1 comme il est montré dans la figure 2.2.

```

CAGCCTCCAGGGTCTTACACACAAATCAGTCAGTGGCCAGAAAGACCCCTCGGAATCG
GAGCAGGGAGGATGGGGAGTGTGAGGGGTATCCTTGATGCTTGTGTGTCCCAACTTTCC
AAATCCCCGCCCGCGATGGAGAAGAAACCGAGACAGAAGGTGCAGGGCCACTACCGC
TTCTCCAGATGAGCTCATGGGTTTCTCCACCAAGGAAGTTTCCGTTGGTTGAATGATT
CTTTCCCGCCCTCTCTCGCCCCAGGGACATATAAGGCAGTTGTTGGCACACCCAGCC
AGCAGACGCTCCCTCAGCAAGGACAGCAGAGGACCAGCTAAGAGGGAGAGAAGCAACTAC
AGACCCCCCTGAAAACAACCCTCAGACGCCACATCCCCTGACAAGCTGCCAGGCAGGTT
CTCTTCTCTCACATACTGACCCAGGGTCCACCCTCTCTCCCTGGAAAGGACACCATG
AGCACTGAAAGCATGATCCGGGACGTGGAGCTGGCCGAGGAGGCGCTCCCAAGAAGACA
GGGGGGCCCCAGGGCTCCAGGGGTGCTTGTCTCTCAGCCTCTTCTCTCTGATCGTG
GCAGGCGCCACCACGCTCTTCTGCCTGCTGCACTTTGGAGTGATCGGCCCCAGAGGGAA
GAG GTGAGTGCCTGGCCAGCCTTCATCCACTCTCCCACCAAGGGGAAATGGAGACGCAA
GAGAGGGAGAGAGATGGGATGGGTGAAAGATGTGCGCTGATAGGGAGGGATGGAGAGAAA
AAAACGTGGAGAAAGACGGGGATGCAGAAAAGAGATGTGGCAAGAGATGGGGAAGAGAGAG
AGAGAAAAGATGGAGAGACAGGATGTCTGGCACATGGAAGGTGCTCACTAAGTGTGTATGG
AGTGAATGAATGAATGAATGAATGAACAAGCAGATATATAAATAAGATATGGAGACAGAT
    
```

Figure 2.2. La séquence encadrée du gène *TNF- α* (l'exon 1)

4. L'outil Primer-blast

À travers la base de données « ressources du National Centre for Biotechnology Information » (NCBI), on a utilisé l'outil Primer blast dans le site « [www. ncbi. nlm. nih. Gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) » afin de concevoir nos amorces (Fig 2.3).

Chapitre 2. Matériel et méthodes

The screenshot shows the NCBI website interface. At the top, there is a navigation bar with 'NCBI Resources' and 'How To' menus, and a search bar. Below this is a red banner with COVID-19 information. The main content area is titled 'All Resources' and contains several tabs: 'All', 'Databases', 'Downloads', 'Submissions', 'Tools', and 'How To'. The 'Tools' tab is highlighted with a red circle and a red arrow labeled '2'. On the left sidebar, under 'Resource List (A-Z)', the 'All Resources' link is highlighted with a red circle and a red arrow labeled '1'. The 'Tools' section lists several tools: '1000 Genomes Browser', 'Amino Acid Explorer', 'BLAST Microbial Genomes', 'BLAST RefSeqGene', and 'BLAST Tutorials and Guides'.

Figure 2.3. Site NCBI

Pour concevoir nos amorces spécifiques du gène *TNF- α* , nous avons suivi les étapes suivantes :

Étape 1 : Il faut Cliquer sur la touche « Primer blast » (Fig 2.4)

The screenshot shows the OSIRIS website. The main content area contains several tool descriptions. The 'Primer-BLAST' tool is highlighted with a red circle. The description for 'Primer-BLAST' states: 'L'outil Primer-BLAST utilise Primer3 pour concevoir des amorces de PCR sur un modèle de séquence. Les produits potentiels sont ensuite automatiquement analysés avec une recherche BLAST sur des bases de données spécifiées par l'utilisateur, pour vérifier la spécificité de la cible visée.'

Figure 2.4. L'outil Primer blast

Chapitre 2. Matériel et méthodes

Étape 2 : On Sélectionne et copie la séquence d'intérêt afin de la coller dans le Primer blast. Par la suite, on renseigne la position du nucléotide du départ de l'amplification et la taille maximale de l'amplicon souhaité, sans oublier de supprimer les intervalles non souhaités au sein de notre amorce (Fig 2.5).

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

Étape 3 : On Clique sur " Database " et on sélectionne l'option " Genomes for selected organisme (primer reference assembly only)" (Fig 2.6). Pour avoir les résultats, on clique sur le bouton ci-dessous " Get Primers ".

Figure 2.6. L'obtention des résultats à travers le primer blast

5. Caractéristiques d'une bonne amorce

Après avoir affiché les résultats du Primer-blast, nous choisissons la paire d'amorces qui répond aux critères suivants :

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

6. In-silico PCR

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

UCSC In-Silico PCR

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

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

About In-Silico PCR

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

Configuration Options

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

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

Chapitre 3. Résultats

1. Résultats du primer blast

Afin de concevoir de bonnes amorces, nous avons tout d'abord utilisé le site Ensembl pour avoir la séquence du gène *TNF- α* qui est composé de 4 exons. Ensuite, en raison de la disponibilité des conditions appropriées pour l'outil Primer-blast, nous avons choisi l'exon 1 pour avoir l'amorce spécifique. Cet outil nous a donné 10 paires d'amorce du gène *TNF- α* (Fig 3.1).

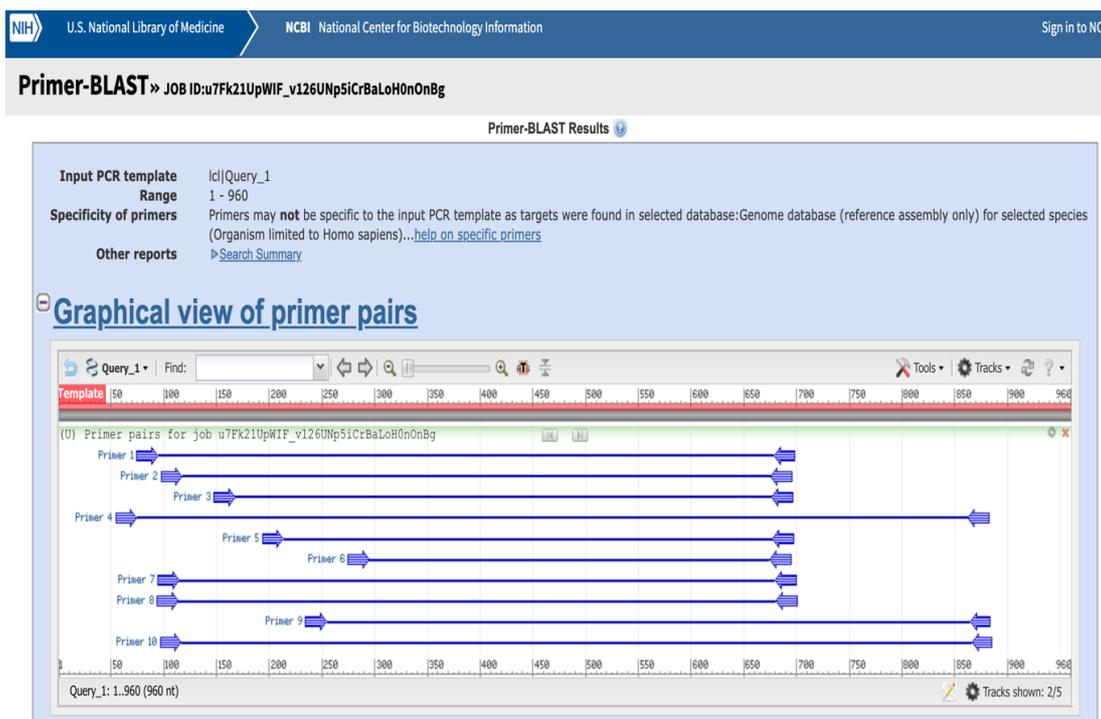


Figure 3.1. Les 10 paires d'amorces

La paire d'amorce numéro 6 a été choisie (Fig 3.2) car elle répond aux critères mentionnés précédemment et qui sont représentés dans tableau 3.1 ci-dessous :

Chapitre 3. Résultats

Paire d'amorces 6									
	Séquence (5' → 3')	Brin de modèle	Longueur	Début	Arrêtez	Tm	GC%	Auto complémentarité	Complémentarité de soi 3'
Amorce avant	AAAGCAGTTGTTGGCACAC	Plus	20	275	294	59,82	50,00	3,00	3,00
Amorce inversée	GAGAGTGGATGAAGGCTGGC	Moins	20	694	675	60,46	60,00	3,00	2,00
Longueur du produit 420									
Produits sur des modèles potentiellement indésirables									
> NC_000006.12 Homo sapiens chromosome 6, GRCh38.p12 Assemblée primaire									
longueur du produit = 420									
Caractéristiques associées à ce produit:									
facteur de nécrose tumorale									
Amorce sens 1 AAAGCAGTTGTTGGCACAC 20									
Modèle 31575539 31575558									
Amorce inversée 1 GAGAGTGGATGAAGGCTGGC 20									
Modèle 31575958 31575939									
> NC_000011.10 Homo sapiens chromosome 11, GRCh38.p12 Assemblée primaire									
longueur du produit = 3340									
Caractéristiques associées à ce produit:									
molécule d'activation dans la protéine d'autophagie régulée par BECN1 ...									
molécule d'activation dans la protéine d'autophagie régulée par BECN1 ...									
Amorce sens 1 AAAGCAGTTGTTGGCACAC 20									
Gabarit 46503868 AT ... C G 46503849									
Amorce inversée 1 GAGAGTGGATGAAGGCTGGC 20									
Modèle 46500529 TTT T 46500548									
> NC_000001.11 Homo sapiens chromosome 1, GRCh38.p12 Assemblée primaire									
longueur du produit = 1816									
Caractéristiques accompagnant ce produit:									
37025 pb sur 5' : protéine FAM131C									
12933 pb sur 3' : @phrine type A récepteur 2 isoforme 2									

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

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

Les critères	Taux optimale	Notre amorce
Longueur	16 à 28 nucléotides	20 nucléotides pour les deux amorces sens et anti-sens
Température de fusion	50 C et 62 C	Amorces sens (59.82 C) Amorces anti-sens (60.46 C)
Teneur en CG	40 à 60%	Amorces sens (50%) Amorces anti-sens (60%)
Amorce spécifique	Inférieur à 1000 pb	420 pb
Produits aspécifiques	Supérieur à 1000 pb	Tous plus de 1000 pb

Pb : paire de base

2. Confirmation des résultats

La réalisation d'une *in silico*-PCR par site <https://genome.ucsc.edu/> nous a donné la localisation de notre produit dans le chromosome 6, ce qui prouve la validité et la spécificité de la paire d'amorces choisie (Fig 3.3).

The screenshot displays the UCSC In-Silico PCR tool interface. At the top, there is a navigation bar with links for Genomes, Genome Browser, Tools, Mirrors, Downloads, My Data, Projects, Help, and About Us. Below this, the tool's name 'UCSC In-Silico PCR' is shown. The main search area contains several input fields: 'Genome:' set to 'Human', 'Assembly:' set to 'Dec. 2013 (GRCh38/hg38)', 'Target:' set to 'genome assembly', 'Forward Primer:' with the sequence 'AAAGGCAGTTGTTGGCA', and 'Reverse Primer:' with the sequence 'GAGAGTGGATGAAGGCT'. There is also a 'submit' button. Below these fields are 'Max Product Size:' (4000), 'Min Perfect Match:' (15), 'Min Good Match:' (15), and a 'Flip Reverse Primer:' checkbox. A section titled 'About In-Silico PCR' explains the tool's function and provides a link to a video. Below that, 'Configuration Options' are listed with definitions for Genome and Assembly, Target, Forward Primer, Reverse Primer, Max Product Size, Min Perfect Match, Min Good Match, and Flip Reverse Primer. The results section shows a genomic location: '>chr6:31575539+31575958 420bp AAAGGCAGTTGTTGGCACAC GAGAGTGGATGAAGGCTGGC' followed by a block of DNA sequence. Finally, 'Primer Melting Temperatures' are provided: Forward: 61.1 C aaagcagttgttggcacac and Reverse: 62.3 C gagagtgatgaagctggc. A note states that temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration, and that the code comes from Primer3.

Figure 3.3. Résultats de confirmation par *in silico*-PCR.

Chapitre 4. Conclusions et perspectives

Les maladies infectieuses sont l'une des principales causes de décès dans le monde. Elles sont responsables de 17 millions de décès par an dans la population mondiale.

Parmi les actions prises par l'organisme dans la lutte contre ces maladies est la production de la cytokine pro-inflammatoire TNF- α par plusieurs types cellulaires, notamment le macrophage. Cette cytokine est nécessaire dans la défense contre les agents infectieux. Cette production doit être vérifiée, parce qu'une surexpression ou bien une libération prolongée peuvent être nocives. Dans ce contexte, les études se focalisent sur l'étude de son expression par le macrophage en utilisant les techniques de biologie moléculaire, comme la PCR afin de vérifier son taux lors d'une infection.

L'objectif de notre travail a consisté de concevoir des amorces spécifiques au gène *TNF- α* . Nous avons pu choisir une paire d'amorces qui répondait aux critères de bonnes amorces et qui a été localisé dans le chromosome 6.

La réalisation d'une PCR en utilisant ses amorces permettra d'offrir de nouvelles pistes dans l'avenir afin de comprendre, détecter et diagnostiquer les maladies infectieuses tout en évaluant l'importance du TNF- α et le macrophage dans ce type de maladies.

Chapitre 5. Références bibliographiques

1. Agut H (2008) Classification et mode de transmission des virus humains. *EMC - Mal. Infect.* 5, 1–9.
2. Akoua VB-T, Kiki-Barro PCM, Konaté A, Kpongbo EA, Kondo FK, Bosson-Vanga H, Asouhoun JSM, Vincent D, Yavo W & Eby IHM (2019) [Clinical and etiological aspects of intertrigos caused by fungal infections in Abidjan (Cote d'Ivoire)]. *Pan Afr. Med. J.* 33, 198.
3. Albert J & Fenyö EM (1990) Simple, sensitive, and specific detection of human immunodeficiency virus type 1 in clinical specimens by polymerase chain reaction with nested primers. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1560–1564.
4. Atri C, Guerfali FZ & Laouini D (2018) Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 19.
5. Bashir S, Sharma Y, Elahi A & Khan F (2016) Macrophage polarization: the link between inflammation and related diseases. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. A1* 65, 1–11.
6. BELAID Nadia (2017) *Elaboration d'amorces pour le gène de la Glutathion peroxydas 3 GPx3*. Tlemcen: UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMEN. Available at: <http://dspace.univ-tlemcen.dz/bitstream/112/12000/1/Belaid-nadia.pdf>.
7. Biswas SK, Chittechath M, Shalova IN & Lim J-Y (2012) Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunol. Res.* 53, 11–24.
8. Bustin S & Huggett J (2017) qPCR primer design revisited. *Biomol. Detect. Quantif.* 14, 19–28.
9. Cabal-Hierro L & Lazo PS (2012) Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell. Signal.* 24, 1297–1305.
10. Cassetta L, Cassol E & Poli G (2011) Macrophage polarization in health and disease. *ScientificWorldJournal* 11, 2391–2402.
11. Chen F (2011) TNF (tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)). *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* Available at: <http://hdl.handle.net/2042/38105> [Accessed March 11, 2020].
12. Chen Y, Jiang W, Yong H, He M, Yang Y, Deng Z & Li Y (2020) Macrophages in osteoarthritis: pathophysiology and therapeutics. *Am. J. Transl. Res.* 12, 261–268.
13. Choi J-P, Kim Y-S, Kim OY, Kim Y-M, Jeon SG, Roh T-Y, Park J-S, Gho YS & Kim Y-K (2012) TNF-alpha is a key mediator in the development of Th2 cell response to inhaled allergens induced by a viral PAMP double-stranded RNA. *Allergy*

67, 1138–1148.

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

15. El Gendy FM, El-Mekkawy MS, El-Naidany SS & El-torgoman ST (2020) The role of Tumor necrosis factor alpha -308 G>A promoter polymorphism in pediatric community acquired pneumonia. *Egypt. Pediatr. Assoc. Gaz.* 68, 5.

16. Elsayed SM, Hassanein OM & Hassan NHA (2019) Influenza A (H1N1) virus infection and TNF-308, IL6, and IL8 polymorphisms in Egyptian population: a case–control study. *J. Basic Appl. Zool.* 80, 61.

17. El-Tahan RR, Ghoneim AM & El-Mashad N (2016) TNF- α gene polymorphisms and expression. *SpringerPlus* 5, 1508.

18. Epelman S, Lavine KJ & Randolph GJ (2014) Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* 41, 21–35.

19. Faustman DL & Davis M (2013) TNF Receptor 2 and Disease: Autoimmunity and Regenerative Medicine. *Front. Immunol.* 4. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2013.00478/abstract> [Accessed March 14, 2020].

20. Fernández-Ruiz M & Aguado JM (2018) Risk of infection associated with anti-TNF- α therapy. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 16, 939–956.

21. Forterre P (2010) Defining life: the virus viewpoint. *Orig. Life Evol. Biosphere J. Int. Soc. Study Orig. Life* 40, 151–160.

22. Gardam MA, Keystone EC, Menzies R, Manners S, Skamene E, Long R & Vinh DC (2003) Anti-tumour necrosis factor agents and tuberculosis risk: mechanisms of action and clinical management. *Lancet Infect. Dis.* 3, 148–155.

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

24. Ghannam MG & Varacallo M (2020) Biochemistry, Polymerase Chain Reaction (PCR). In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535453/> [Accessed April 11, 2020].

25. Ghoneim AM (2019) Lack of association between 4 key TNF-alpha promoter polymorphisms and hepatitis C virus infection in a population of Egyptian patients. *Biomed. Res. Ther.* 6, 3156–3165.

26. Gordon S & Martinez FO (2010) Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. *Immunity* 32, 593–604.

27. Gulliford MC, Sun X, Charlton J, Winter JR, Bunce C, Boiko O, Fox R, Little P, Moore M, Hay AD, Ashworth M & And SafeAB Research Group (2020) Serious bacterial infections and antibiotic prescribing in primary care: cohort study using

Chapitre 5. Références bibliographiques

electronic health records in the UK. *BMJ Open* 10, e036975.

28. Ham B, Fernandez MC, D'Costa Z & Brodt P (2016) The diverse roles of the TNF axis in cancer progression and metastasis. *Trends Cancer Res.* 11, 1–27.

29. Hardyman MA, Wilkinson E, Martin E, Jayasekera NP, Blume C, Swindle EJ, Gozzard N, Holgate ST, Howarth PH, Davies DE & Collins JE (2013) TNF- α -mediated bronchial barrier disruption and regulation by src-family kinase activation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 132, 665-675.e8.

30. Josephs SF, Ichim TE, Prince SM, Kesari S, Marincola FM, Escobedo AR & Jafri A (2018) Unleashing endogenous TNF-alpha as a cancer immunotherapeutic. *J. Transl. Med.* 16, 242.

31. Kadri K (2020) Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. In M. L. Nagpal, O.-M. Boldura, C. Baltă, & S. Enany, eds. *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*. IntechOpen. Available at: <https://www.intechopen.com/books/synthetic-biology-new-interdisciplinary-science/polymerase-chain-reaction-pcr-principle-and-applications> [Accessed April 10, 2020].

32. Katanov C, Lerrer S, Liubomirski Y, Leider-Trejo L, Meshel T, Bar J, Feniger-Barish R, Kamer I, Soria-Artzi G, Kahani H, Banerjee D & Ben-Baruch A (2015) Regulation of the inflammatory profile of stromal cells in human breast cancer: prominent roles for TNF- α and the NF- κ B pathway. *Stem Cell Res. Ther.* 6, 87.

33. Knipe DM, Raja P & Lee J (2017) Viral gene products actively promote latent infection by epigenetic silencing mechanisms. *Curr. Opin. Virol.* 23, 68–74.

34. Kumar A, Abbas W & Herbein G (2013) TNF and TNF Receptor Superfamily Members in HIV infection: New Cellular Targets for Therapy? *Mediators Inflamm.* 2013, 1–13.

35. Kumar A, Coquard L & Herbein G (2015) Targeting TNF-Alpha in HIV-1 Infection. *Curr. Drug Targets* 17, 15–22.

36. Lee HS, Park H-W, Song W-J, Jeon EY, Bang B, Shim E, Moon H-G, Kim Y-K, Kang H-R, Min K-U & Cho S-H (2016) TNF- α enhance Th2 and Th17 immune responses regulating by IL23 during sensitization in asthma model. *Cytokine* 79, 23–30.

37. Li H-Q, Li Z, Liu Y, Li J-H, Dong J-Q, Gao J-R, Gou C-Y & Li H (2005) Association of polymorphism of tumor necrosis factor-alpha gene promoter region with outcome of hepatitis B virus infection. *World J. Gastroenterol.* 11, 5213–5217.

38. Lindahl JF & Grace D (2015) The consequences of human actions on risks for infectious diseases: a review. *Infect. Ecol. Epidemiol.* 5, 30048.

39. López P, Girardi E & Pfeffer S (2019) Importance des microARN

Chapitre 5. Références bibliographiques

cellulaires dans la régulation des infections virales. *médecine/sciences* 35, 667–673.

40. López-Fuertes L, Campos E, Doménech N, Ezquerro A, Castro JM, Domínguez J & Alonso F (2000) Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus down-modulates TNF- α production in infected macrophages. *Virus Res.* 69, 41–46.

41. Lu L, Shi W, Deshmukh RR, Long J, Cheng X, Ji W, Zeng G, Chen X, Zhang Y & Dou QP (2014) Tumor Necrosis Factor- α Sensitizes Breast Cancer Cells to Natural Products with Proteasome-Inhibitory Activity Leading to Apoptosis I. Ulasov, ed. *PLoS ONE* 9, e113783.

42. Lukeš J, Kuchta R, Scholz T & Pomajbíková K (2014) (Self-) infections with parasites: re-interpretations for the present. *Trends Parasitol.* 30, 377–385.

43. Lv N, Gao Y, Guan H, Wu D, Ding S, Teng W & Shan Z (2015) Inflammatory mediators, tumor necrosis factor- α and interferon- γ , induce EMT in human PTC cell lines. *Oncol. Lett.* 10, 2591–2597.

44. Mandell GL, Bennett JE & Dolin R eds. (2010) *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases* 7th ed., Philadelphia, PA: Churchill Livingstone/Elsevier.

45. Murray PJ (2017) Macrophage Polarization. *Annu. Rev. Physiol.* 79, 541–566.

46. Nicholson LB (2016) The immune system. *Essays Biochem.* 60, 275–301.

47. O'Toole G, Kaplan HB & Kolter R (2000) Biofilm Formation as Microbial Development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 49–79.

48. Parameswaran N & Patil S (2010) Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 20, 87–103.

49. Pelt-Verkuil E van, Belkum A van & Hays JP (2008) *Principles and technical aspects of PCR amplification*, Dordrecht: Springer.

50. Rossi AFT, Contiero JC, Manoel-Caetano F da S, Severino FE & Silva AE (2019) Up-regulation of tumor necrosis factor- α pathway survival genes and of the receptor TNFR2 in gastric cancer. *World J. Gastrointest. Oncol.* 11, 281–294.

51. S. Pontier (2007) Infections fongiques.

52. Sacco R, Shah S, Leeson R, Moraschini V, de Almeida Barros Mourão CF, Akintola O & Lalli A (2020) Osteonecrosis and osteomyelitis of the jaw associated with tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) inhibitors: a systematic review. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 58, 25–33.

53. Saha P & Smith A (2018) TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α): A Paradox in Thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 38, 2542–2543.

Chapitre 5. Références bibliographiques

54. Saizonou J, Ouédraogo L, Paraiso MN, Ayélo P, Kpozèhouen A, Daraté R & Traoré E (2014) Epidémiologie et prise en charge des infections du per-partum à la maternité du centre hospitalier départemental de l'Ouémé-Plateau au Bénin. *Pan Afr. Med. J.* 17. Available at: <http://www.panafrican-med-journal.com/content/article/17/89/full/> [Accessed March 31, 2020].
55. Schmid M, Speiseder T, Dobner T & Gonzalez RA (2014) DNA virus replication compartments. *J. Virol.* 88, 1404–1420.
56. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili S-A, Mardani F, Seifi B, Mohammadi A, Afshari JT & Sahebkar A (2018) Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell. Physiol.* 233, 6425–6440.
57. Sica A & Mantovani A (2012) Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* 122, 787–795.
58. Speeckaert MM, Speeckaert R, Laute M, Vanholder R & Delanghe JR (2012) Tumor Necrosis Factor Receptors: Biology and Therapeutic Potential in Kidney Diseases. *Am. J. Nephrol.* 36, 261–270.
59. Sprecher E & Becker Y (1992) Detection of IL-1?, TNF-?, and IL-6 gene transcription by the polymerase chain reaction in keratinocytes, Langerhans cells and peritoneal exudate cells during infection with herpes simplex virus-1. *Arch. Virol.* 126, 253–269.
60. Tham KM & Moon CD (1996) Polymerase chain reaction amplification of the thymidine kinase and protein kinase-related genes of channel catfish virus and a putative pilchard herpesvirus. *J. Virol. Methods* 61, 65–72.
61. Touati Soumia (2013) *Conception des amorces encadrant le SNP rs6232 du gène PCSK1 associé à l'obésité*. Tlemcen: Université Abou Bekr Belkaid.
62. Tseng W-Y, Huang Y-S, Lin H-H, Luo S-F, McCann F, McNamee K, Clanchy F & Williams R (2018) TNFR signalling and its clinical implications. *Cytokine* 101, 19–25.
63. Uhel F, Zafrani L & Commission de la recherche translationnelle de la Société de réanimation de langue française (2019) Nouvelles techniques de biologie moléculaire. *Médecine Intensive Réanimation*. Available at: <https://rea.revuesonline.com/10.3166/rea-2019-0119> [Accessed May 14, 2020].
64. Vallone PM & Butler JM (2004) AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *BioTechniques* 37, 226–231.
65. Wajant H & Siegmund D (2019) TNFR1 and TNFR2 in the Control of the Life and Death Balance of Macrophages. *Front. Cell Dev. Biol.* 7, 91.
66. Wang N, Liang H & Zen K (2014) Molecular Mechanisms That Influence

Chapitre 5. Références bibliographiques

the Macrophage M1 to M2 Polarization Balance. *Front. Immunol.* 5. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00614/abstract> [Accessed April 10, 2020].

67. Wang Y, Smith W, Hao D, He B & Kong L (2019) M1 and M2 macrophage polarization and potentially therapeutic naturally occurring compounds. *Int. Immunopharmacol.* 70, 459–466.

68. Weston D (2010) The pathogenesis of infection and immune response. *Br. J. Nurs.* 19, S4–S11.

69. Williams JW, Giannarelli C, Rahman A, Randolph GJ & Kovacic JC (2018) Macrophage Biology, Classification, and Phenotype in Cardiovascular Disease: JACC Macrophage in CVD Series (Part 1). *J. Am. Coll. Cardiol.* 72, 2166–2180.

70. Wu J-S, Lee C, Wu C-C & Shiue Y-L (2004) Primer design using genetic algorithm. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 20, 1710–1717.

71. Wynn TA, Chawla A & Pollard JW (2013) Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496, 445–455.

72. Zelová H & Hošek J (2013) TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflamm. Res.* 62, 641–651.

73. Zhang X, Wang J, Shao H & Zhu W (2017) Function of tumor necrosis factor alpha before and after mutation in gastric cancer. *Saudi J. Biol. Sci.* 24, 1920–1924.

74. Zhong Y, Huang L, Zhang Z, Xiong Y, Sun L & Weng J (2016) Enhancing the specificity of polymerase chain reaction by graphene oxide through surface modification: zwitterionic polymer is superior to other polymers with different charges. *Int. J. Nanomedicine* Volume 11, 5989–6002.

Résumé

Introduction : L'infection est l'invasion de l'organisme par des agents étrangers. Les macrophages sont des acteurs de l'immunité innée et considérés comme la première ligne de défense contre les infections. Ces cellules éliminent l'infection par une inflammation dans laquelle, elles phagocytent les microbes ou par la sécrétion de plusieurs types de cytokines pro-inflammatoires, notamment le $TNF-\alpha$. L'étude de l'expression du gène qui code cette protéine offrira des possibilités de caractériser le type de macrophage impliqué dans la réponse anti-infectieuse.

Objectif : L'objectif de notre travail est de concevoir des amorces du gène $TNF-\alpha$ exprimé par les macrophages pro-inflammatoires (M1) au cours des infections.

Matériel et méthodes : La conception des amorces pour le gène $TNF-\alpha$ a été effectuée en utilisant l'outil Primer-Blast du site « www.ncbi.nih.gov ». Cet outil nous a permis de donner plusieurs paires d'amorces dont la plus fiable qui répond aux critères de choix de bonnes amorces a été choisie puis vérifiée par la suite par *in silico*-PCR.

Résultats : A cause des produits aspécifiques supérieurs à 1000 paires de bases, la seconde paire des amorces a été choisie. Cette paire répond également à tous les critères de bonnes amorces.

Conclusion : le choix d'une bonne paire d'amorces participe fortement à la réussite de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), afin d'amplifier correctement le gène $TNF-\alpha$ et étudier son rôle dans l'immunité anti-infectieuse.

Mots clés : Infections, Macrophage, $TNF-\alpha$, PCR, amorces.

Abstract

Background: Infection is the body invasion by foreign agents. Macrophages are agents of innate immunity and they are considered as the first line of defense against infections. These cells clear the infection through inflammation in which they phagocytose microbes or through the secretion of several types of pro-inflammatory cytokines, including TNF-alpha. The study of the expression of the gene which encodes this protein will offer possibilities to characterize the type of macrophage involved in the anti-infectious response.

Objective: The objective of our work is to design primers for the $TNF-\alpha$ gene expressed by pro-inflammatory macrophages (M1) during infections.

Material and methods : The design of the primers for the $TNF-\alpha$ gene was done using the Primer-Blast tool from "www.ncbi.nih.gov". This tool allowed us to give several pairs of primers, of which the most reliable which meets the criteria for choosing good primers was chosen and then verified by *in silico*-PCR.

Results : Because of the non-specific products greater than 1000 base pairs, the second pair of primers was chosen. This pair also meets all the criteria for good primers.

Conclusions: The choice of the right pair of primers is strongly involved in the success of the polymerase chain reaction (PCR), the pair of primers chosen to correctly amplify the $TNF-\alpha$ gene and study its role in anti-infective immunity.

Keywords : Infections, Macrophage, $TNF-\alpha$, PCR, primers.

ملخص

لمقدمة: العدوى هي غزو الجسم من قبل عوامل أجنبية، البلاعم هي عوامل المناعة الفطرية وهي خط الدفاع الأول ضد العدوى، تعمل هذه الخلايا على إزالة العدوى من خلال الالتهاب الذي يتسبب في حدوث بلعمة الميكروبات أو من خلال إفراز عدة أنواع من السيتوكينات المؤيدة للالتهابات، بما في ذلك $TNF-\alpha$. توفر دراسة التعبير عن الجين الذي يشفر هذا البروتين إمكانيات لتوصيف نوع البلاعم المشاركة في الاستجابة المضادة للعدوى.

الهدف: الهدف من عملنا هو تصميم البادئات لجين $TNF-\alpha$ المعبر عنها بواسطة البلاعم المؤيدة للالتهابات (M1) أثناء العدوى.

المواد والطرق: تم تصميم البادئات لجين $TNF-\alpha$ باستخدام أداة Primer Blast من الموقع "www.ncbi.nih.gov". سمحت لنا هذه الأداة بالحصول على عدة أزواج من البادئات، تم اختيار أكثرها موثوقية والذي يلبي كل المعايير حيث تم التحقق منها في *In-silico* PCR.

النتائج: بسبب المنتجات غير المحددة التي تزيد عن 1000 زوج أساسي، تم اختيار الزوج المثالي من البادئات. يفي هذا الزوج أيضاً بجميع معايير البادئات الجيدة.

الخلاصة: إن اختيار الزوج المناسب من البادئات له دور كبير في نجاح تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) من أجل تضخيم جين $TNF-\alpha$ بشكل صحيح ودراسة دوره في المناعة المضادة للعدوى.

الكلمات المفتاحية: الالتهابات، الضامة، $TNF-\alpha$ ، PCR، البادئات.