



UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID-TLEMCCEN
Faculté SNV-STU
Département de Biologie



Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et immunologie W0414100

Mémoire

Présentée par

SEDJAI Dounia

En vue de l'obtention du Diplôme de MASTER

En Immunologie

Sous la direction du Professeur

ARIBI Mourad

Soutenu le 20 / 09 /2020

Intitulé :

NF-KB molécule clé du processus inflammatoire

Devant le jury :

Pr. Chams Eddine SMAHI	Professeur	université de Tlemcen	Président
Pr. Mourad ARIBI	Professeur	université de Tlemcen	Encadreur
Dr. Nabila BRAHAMI	Maitre universitaire de conférence A	université de Tlemcen	Examinatrice

Septembre 2019 / 2020



UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID-TLEMCEM
Faculté SNV-STU
Département de Biologie



Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et immunologie W0414100

Mémoire

Présentée par

SEDJAI Dounia

En vue de l'obtention du Diplôme de MASTER

En Immunologie

Sous la direction du Professeur

ARIBI Mourad

Soutenu le 20 / 09 /2020

Intitulé :

NF-KB molécule clé du processus inflammatoire

Devant le jury :

Pr. Chams Eddine SMAHI	Professeur	université de Tlemcen	Président
Pr. Mourad ARIBI	Professeur	université de Tlemcen	Encadreur
Dr. Nabila BRAHAMI	Maitre universitaire de conférence A	université de Tlemcen	Examinatrice

Septembre 2019 / 2020

Résumé

Introduction : Le processus inflammatoire est défini comme une réponse cellulaire multiphasique et multifactorielle à une variété de stimulants pathologiques.

Plusieurs cellules et molécules inflammatoires sont impliquées dans le processus inflammatoire, parmi ces derniers le facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) qui joue un rôle majeur dans l'orchestration de la réponse inflammatoire, en raison de sa capacité d'induire l'expression d'un grand nombre de gènes qui participent dans la régulation de l'inflammation.

Objectif : Réalisation d'une séquence d'oligonucléotides qui servira d'une amorce pour une PCR.

Matériel et Méthodes : Concevoir une amorce de l'exon 6 du gène *NF- κ B1* à l'aide de programme Primer- Blast *via* le site « www.ncbi.nih.gov ».

Résultat : Le choix est porté sur la première paire d'amorce du gène *NF- κ B1* en raison des critères requis et des produits aspécifiques supérieur à 1000 paires de bases.

Conclusion : Dans cette étude, nous avons conçus des amorces à l'aide de l'outil Primer-Blast dans le but de réaliser ultérieurement une PCR et amplifier le gène *NF- κ B1*, cette étape est très importante pour déterminer l'expression de ce gène dans le processus inflammatoire, ainsi que pour développer des stratégies thérapeutiques spécifique et efficace pour divers pathologies inflammatoires.

Mot clé : Processus inflammatoire, Gène *NF- κ B1*, Conception d'amorce, Primer- Blast.

Abstract

Introduction: The inflammatory process is defined as a multiphasic and multifactorial cellular response to a variety of pathological stimulants.

Several inflammatory cells and molecules are involved in the inflammatory process, among them the nuclear factor kappa B (NF- κ B) which plays a major role in the orchestration of the inflammatory response, due to its ability to induce expression a large number of genes involved in the regulation of inflammation.

Objective: Realization of an oligonucleotide sequence that will serve as a primer for a PCR.

Materials and Methods: Design a primer for exon 6 of the NF- κ B1 gene using the Primer-Blast program via the site "www.ncbi.nih.gov".

Result: The choice is made on the first primer pair of the NF- κ B1 gene because of the required criteria and non-specific products greater than 1000 base pairs.

Conclusion: In this study, we designed primers using the use of the Primer-Blast program in order to subsequently perform PCR and amplify the NF- κ B1 gene, this step is very important to determine the expression of this gene in the inflammatory process, as well as to develop specific and effective therapeutic strategies for various inflammatory pathologies.

Keyword: Inflammatory process, NF- κ B1 gene, Primer design, Primer-Blast.

ملخص

المقدمة: يتم تعريف العملية الالتهابية على أنها استجابة خلوية متعددة الأطوار ومتعددة العوامل لمجموعة متنوعة من المحفزات المرضية من أجل حماية أنسجة المستهدف.

تشارك العديد من الخلايا والجزئيات الالتهابية؛ من بين هؤلاء ، العامل النووي $NF-\kappa B$ ، الذي يلعب دورًا رئيسيًا في تنظيم الاستجابة الالتهابية؛ بسبب قدرته على إحداث التعبير عن عدد كبير من الجينات المشاركة في الالتهاب.

المواد وطريقة: تصميم تمهيدي يحيط -. exon 6 من جين $NF-\kappa B1$ باستخدام برنامج Primer- Blast عبر موقع www.ncbi.nih.gov.

نتيجة: يعطي التصميم التمهيدي للجين. $NF-\kappa B1$ من exon 6 الزوج الأول كبدية محددة للجين. $NFKB1$

خاتمة: لخلاصة: في هذه الدراسة ، قمنا بتصميم مواد أولية باستخدام برنامج Primer-Blast من أجل إجراء PCR لاحقًا وتضخيم جين $NF-\kappa B1$ ، وهذه الخطوة مهمة جدًا لتحديد التعبير عن هذا الجين في العملية الالتهابية ، وكذلك لتطوير استراتيجيات علاجية محددة وفعالة لمختلف الأمراض الالتهابية.

الكلمات الرئيسية: العملية الالتهابية ، الجين $NFKB1$ ، التصميم التمهيدي ، Primer- Blast. **موضوعي:** يتكون من تصميم

أساس محدد للجين $NF-\kappa B1$ مرتبط بعملية الالتهاب.

Avant-propos

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et immunologie (BIOMOLIME), Université de Tlemcen, sous la direction du professeur Mourad ARIBI.

En premier lieu je remercie profondément mon professeur Mourad ARIBI le directeur du laboratoire BIOMOLIME, Biologie Moléculaire Appliquée et immunologie qui m'a honoré en acceptant de diriger ce travail pour ses conseils, ses commentaires, ses corrections et à sa disponibilité. J'exprime mon sincère respect ma profonde gratitude et ma respectueuse considération de vos qualités scientifiques.

Je remercie également Dr NOUARI Wafaa pour l'enseignement, ses conseils, ses orientations et merci pour votre gentillesse.

Je remercie ainsi tous les membres du laboratoire et la promotion de Master 2 immunologie 2019 / 2020 pour tous les bons souvenirs durant de mes années d'études.

Je tiens à remercier mille fois ma famille pour tout le soutien moral que vous m'avez apporté durant ces années de formation.

Je remercie également les membres du jury pour leur soutien et leurs honorables présences.

Je dédie mon travail à mes parents ; mes frères, mes sœurs et ainsi à mes amis (ies) et à toutes les personnes que j'estime.

Table des matières

Résumé

Abstract

Résumé en Arabe

Avant – propos

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction

Chapitre 1. Revue de littérature

1.1 Inflammation

1.1.1. Généralité

1.1.2. Formes cliniques de l'inflammation

1.1.3. Acteurs de l'inflammation

1.1.4. Mécanismes de réponse inflammatoire

1.2. Gène *NF-κB*

1.2.1. Généralité

1.2.2. Protéine NF-κB

1.2.3. Voie de signalisation de NF-κB

1.2.4. NF- κ B et l'inflammation

1.2.4.1. Rôle de NF- κ B dans l'expression des gènes pro inflammatoires

1.2.4.2. Activation de NF- κ B dans des cellules immunitaires

1.2.4.3. Le rôle du NF- κ B dans la résolution de l'inflammation

1.2.4.4. NF- κ B et les maladies inflammatoires

1.3. PCR

1.3.1. Définition

1.3.2. Principe

1.3.3. Etapes

1.3.4. Acteur du PCR

1.3.5. Choix d'amorce

1.4. Problématique

1.5. Objective

1.6. But

Chapitre 2. Matériel et Méthode

2.1. Conception des amorces

2.2. Conception d'amorces du gène *NF- κ B1*

2.2.1. Recherche de la séquence de référence du gène *NF- κ B 1*

2.2.3. Le design des primer

2.2.3.1. Les étapes de Primer-Blast

2.2.4. Critères de la bonne amorce

Chapitre 3. Résultat et discussion

Chapitre 4. Conclusion et perspective

Chapitre 5. Bibliographie

Liste des figures

Figure 1.1. Acteurs de la voie inflammatoire.

Figure 1.2. Signalisation TLR.

Figure 1.3. Mécanisme de réponse inflammatoire.

Figure 1.4. Localisation du gène *NF- κ B 1*.

Figure 1.5. Famille de NF- κ B et IKB.

Figure 1.6. Voie de signalisation de NF- κ B.

Figure 1.7. Les gènes cibles NF- κ B impliqué dans le développement et dans la progression d'inflammation.

Figure 1.8. Etapes d'amplification par PCR d'une ADN cible.

Figure 2.1. Plat forme de la base de donnée Ensemble.

Figure 2.2. La séquence du gène *NF- κ B1* à partir de plat forme Ensemble.org.

Figure 2.3. La séquence de l'exon 6 du gène *NF- κ B1*.

Figure 2.4. NCBI (National centre for Biotechnologie Information).

Figure 2.5. L'outil de Primer- Blast.

Figure 2.6. Analyse de la séquence d'intérêt par le Primer- Blast.

Figure 3.1. Résulta de Primer- Blast.

Figure 2.2. Confirmation du résultat par le site UCSC In Silico PCR.

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Classification de l'inflammation en fonction de la cause.

Tableau 1.2. Activateurs importants de NF- κ B.

Tableau 1.3. Gènes cibles importants de NF- κ B.

Liste d'abréviation

NFKB: nuclear factor kappa B

IKK: IKB Kinase

NIK: NF- κ B inducing kinase

PRR: pathogen associated molecular Patten

DAMP: damage associated molecular Patten

TLR: Toll like receptor

TGF: transforming Growth

LPS: lipo polysaccharide

FOXOP3: forkead box p3

RHD: domain d'homologie Rel

D' NTP: désoxynucléotides tri phosphates

PCR: polymerase chaine reaction

Introduction

Introduction

Le processus inflammatoire est défini comme une réponse cellulaire multiphasique et multifactorielle à une variété de stimulant pathologiques, afin de protéger les tissus de l'hôte (de Jesús and Ramakrishnan, 2020). Ce processus est caractérisé par une dilatation vasculaire, perméabilité accrue du capillaire, augmentation du flux sanguin, et le recrutement de leucocytes vers le site enflammé (Freire and Van Dyke, 2013).

De plus, il stimule également l'activation de divers voies de signalisation qui régulent l'expression des médiateurs inflammatoires aux sein des cellules (Chen et *al.*, 2018).

Ces réponses inflammatoires sont étroitement contrôlées et régulées afin de maintenir l'homéostasie, cependant si l'inflammation persiste après l'élimination du dommage ou de l'infection, elle entraîne le développement d'une variété des maladies inflammatoires et maladies auto-immunes chroniques (de Jesús and Ramakrishnan, 2020).

Donc la régulation et le contrôle de l'inflammation sont nécessaires pour la santé de l'organisme.

A ce jour, plusieurs études montrent l'implication des gènes *NF- κ B* dans la régulation du processus inflammatoire et dans la régulation de la réponse immunitaire.

Le NF- κ B est un facteur de transcription inductible exprimé de manière omniprésent dans toutes les cellules du corps. Il est composé de cinq sous unité protéique qui sont RelA ; RelB ; c Rel ; p105 / p50 et p100 / p52 qui forment des homo et hétéro dimères fonctionnelles (de Jesús and Ramakrishnan, 2020), chaque sous unité est codé par cinq gènes respectivement :les gènes *REL A*, *REL B*, *C REL* et les gènes *NF- κ B1* et *NF- κ B2*.

Le gène le plus étudié dans ce processus c'est le gène *NF- κ B1* en raison de sa capacité d'induire l'expression de divers gènes des chimiokines et des cytokines qui contrôle et régule les différents phases d'inflammation. Notre travail est basé sur l'implication de conception d'amorce du gène *NF- κ B1* à l'aide de l'outil Primer-Blast. Afin d'amplifier la séquence d'oligonucléotide qui participe dans le processus inflammatoire par l'intermédiaire d'une PCR dans des future études.

Chapitre 1. Revue de littérature

1.1. L'inflammation

1.1.1. Généralité

L'inflammation est un processus biologique complexe du système immunitaire qui peut être initié par divers facteurs : facteurs chimiques (acide alcalins), physiques (rayonnement, ionisants, champ magnétique, onde ultrasonores) et biologiques (virus, bactéries, champignons, exotoxines et endotoxine) (Sochocka et *al.*, 2017).

L'objectif principal de l'inflammation est l'élimination des différents stimulants nocifs et l'initiation de processus de guérison pour protéger le corps humain et maintenir l'homéostasie (Chen et *al.* 2018). L'inflammation est une réponse protectrice indispensable à la santé et à la lutte contre les maladies (Freire and Van Dyke, 2013) .

Tableau1.1: Classification de l'inflammation en fonction de la cause (Hawiger and Zienkiewicz, 2019).

Type d'inflammation	Cause de l'inflammation	Exemples de maladies médiées par un type d'inflammation donné
Inflammation microbienne	Bactéries, champignons, virus et protozoaires	Abcès; Pneumonie; État septique; Fièvre hémorragique Ebola
Inflammation auto-immune	Attaque auto-immune aberrante par des auto-anticorps et / ou des cellules B et T autoréactives	Diabète de type 1; Sclérose en plaque; La polyarthrite rhumatoïde; Psoriasis; Le lupus érythémateux disséminé
Inflammation allergique	Allergènes (Ex. Pollen, acariens, squames animales, champignons, piqûres d'insectes et piqûres)	Dermatite atopique / eczéma; Fièvre des foins; Asthme; Dermatite de contact; Anaphylaxie; Réactions d'hypersensibilité aux médicaments
Inflammation métabolique	Accumulation excessive de métabolites (par exemple esters de cholestéryle ou acide urique)	Athérosclérose, Goutte; Phénylcétonurie
Inflammation physique	Traumatisme, brûlures ou rayonnement	Blessure post-traumatique; Brûlures chimiques, électriques et thermiques (brûlures); Blessures dues aux radiations

Chapitre 1. Revue de littérature

Au niveau des tissus l'inflammation est définie par quatre signaux : rougeur, gonflement, chaleur, et douleur. Ce qui provoque par la suite la perte de la fonction tissulaire (Freire and Van Dyke, 2013). Ces résultats correspondent à l'activation d'une cascade de réaction inflammatoire qui affectent le tissu endommagé, ces réactions sont caractérisées principalement par une vasodilatation, l'accumulation, et le recrutement des leucocytes avec des protéines plasmatiques du sang vers le site d'infection ou la lésion tissulaire (Zhang and Sun, 2015).

L'activation des cellules résidentes des tissus endommagés vont déclencher immédiatement lors du processus inflammatoire y compris les macrophages, les cellules dendritiques et les mastocytes qui vont sécréter divers médiateurs tels que les chimiokines, cytokines, les amines et les vasoactives qui ont la capacité d'amplifier l'inflammation et servent à l'extravasation des leucocytes vers le tissu lésé (Gasparini and Feldmann, 2012).

1.1.2. Forme clinique de l'inflammation

L'inflammation est à l'origine de développement de plusieurs maladies, elle est déclenchée par diverses agressions : microbiennes, allergiques, auto-immunité, métaboliques, et physiques qui permettent d'impliquer différents types de réponse inflammatoire (Hawiger and Zienkiewicz, 2019). Cependant, l'amplitude de la réponse inflammatoire dépend : l'intensité de l'antigène, types d'antigènes et son effet sur les tissus ce qui permet de différencier deux types d'inflammation : état inflammatoire aiguë et état inflammatoire chronique (Sochocka et al, 2017).

• L'inflammation aiguë

L'inflammation aiguë est une réponse physiologique localisée dans les tissus vascularisés, afin d'éradiquer le pathogène et maintenir l'homéostasie (Freire and Van Dyke, 2013). L'apparition de la réponse inflammatoire aiguë est provoquée immédiatement lors d'une stimulation par un pathogène ou d'une lésion tissulaire (Eming et al., 2007). Ce mécanisme est impliqué par trois phases : phase d'initiation (pro-inflammatoire), phase d'adaptation (anti-inflammatoire) et une phase de résolution (restauration de l'homéostasie), ces dernières sont contrôlées par une reprogrammation épigénétique qui dépend de l'activation de certains gènes et la suppression des autres gènes (Gasparini and Feldmann, 2012).

Habituellement lors d'une inflammation aiguë l'ensemble d'interactions moléculaires et cellulaires contribue à la réparation, le renouvellement et l'adaptation de nombreux tissus

(Franceschi and Campisi, 2014).

Chapitre 1. Revue de littérature

• Inflammation chronique

L'inflammation chronique partage de nombreux caractéristiques de l'inflammation aiguë, elle est généralement de base grade et persistante (Franceschi and Campisi, 2014).

Leur propriété principale est l'incapacité de l'élimination de déclencheur inflammatoire et l'incapacité de l'élimination du cellules inflammatoires apoptotiques (Freire and Van Dyke, 2013). Cette état peut développer par divers mécanismes tel que les infections chroniques, les lésions tissulaires non réparer, la persistance des allergènes ou les particules étrangers (Gasparini and Feldmann, 2012), ou par la production successive des cytokines par les réponses inflammatoires (Franceschi and Campisi, 2014).

En conséquence l'inflammation chronique est contribué à la dégénération des tissus et au développement de divers maladies auto-immunes (Sochocka et *al.*, 2017).

1.1.3. Acteur de l'inflammation

L'inflammation est une réponse très complexe à une infection ou à une blessure (J., 2013). Cependant le spectre de la réponse inflammatoire est impliquée à un réseau hautement coordonnée de nombreux types de composants, parmi eux on distingue : les indicateurs inflammatoires, les captures qui les détectent et les médiateurs inflammatoires (Freire and Van Dyke, 2013).

• Polynucléaire

Les polynucléaires sont réparties de la ligne myéloïde et représentent 1% des leucocytes sanguin (Rostan et *al.*, 2014). Il est bien établie que les polynucléaires jouent un rôle majeur dans la défense immunologique principalement dans les réponses inflammatoires, car ils ont la capacité de migrer selon un gradient chimio attractant vers le site enflammé, où ils sont exercés différents fonctions immunologiques parmi eux : la libération d'une grande variété du médiateur tel que les cytokines, les chimiokines qui vont améliorer et amplifier les réponses inflammatoires et qui peuvent servir du premier lien entre la réponse immunitaire innée et acquise (Li et *al.*, 2016).

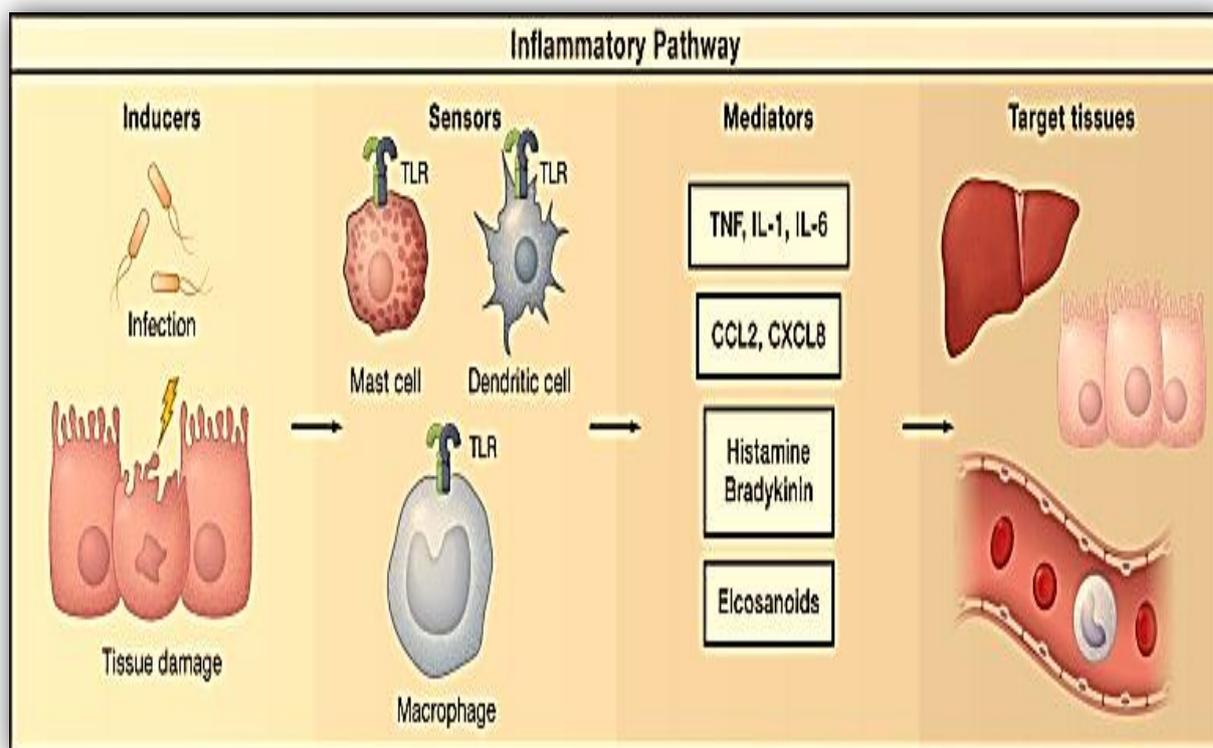


Figure 1.1. Acteurs de la voie inflammatoire : La voie inflammatoire se compose d'inducteur inflammatoire, de capture, de médiateur inflammatoire et de tissus cible. Les indicateurs initier la réponse inflammatoire et sont détectés par des captures tel que les récepteurs toll like (TLR) qui sont exprimés sur des cellules sentinelles spécialisées ,telle que les macrophages , les cellules dendritiques et les mastocytes , ces dernier induise la production de diffèrent médiateurs inflammatoires comme les cytokines , les chimiokines , les amines et les eicosanoides par la suite ces médiateurs agissent sur divers tissus cibles (Medzhitov, 2010).

- **Macrophage et monocyte**

Les macrophages et les monocytes sont des acteurs essentiels de l'immunité innée et de l'inflammation, car ils exercent nombreux fonctions immunologiques comme la phagocytose et la présentation d'antigène (Eming et *al.*, 2007). En plus ces cellules partagent de nombreux récepteurs de reconnaissances antigéniques tel que les PRR qui vont connaitre les modèles moléculaires associés aux dommages (DAMP), ces récepteurs ont plusieurs types parmi eux on distingue : les TLR, les récepteurs RIGI , les NLR et les récepteurs lectine de type C , par la suite ces récepteurs correspond à l'activation de plusieurs voies de signalisations (Liu et *al.*, 2017), qui stimulent la production de nombreux médiateurs inflammatoires amplificateurs d'inflammation on indique : le TGF β , TGF α , facteur de croissance des fibroblastes , facteur de croissance dérivé des plaquettes et le facteur de croissance endothélial vasculaire (Eming et *al.*, 2007).

Chapitre 1. Revue de littérature

• Mastocyte

Les mastocytes forment une population supplémentaire de leucocyte résident dans le tissu conjonctif et dans la peau (Eming et *al.*, 2007). Ce sont des cellules effectrices qui favorisent l'inflammation par la libération d'une variété des médiateurs inflammatoires y compris les cytokines, les chimiokines, l'histamine, les protéases, les prostaglandines et les leucotriènes (Chen et *al.*, 2018). En plus les mastocytes ont également un rôle important dans la réparation des tissus (Eming et *al.*, 2007).

• cellules T

Les acteurs de l'immunité adaptative sont également impliqués dans l'inflammation, notamment la sous population des cellules T auxiliaires, qui sont polarisées et activées en différentes sous populations produisant diverses cytokines (Zhang and Sun, 2015). La sous population des cellules Th1 caractérisent principalement par la production d'IFN γ , IL2 et le TNF α . La sous population des cellules Th2 vont produire essentiellement IL4, IL5 et IL10, ces cellules peuvent participer dans divers processus y compris le remodelage tissulaire et dans les interactions directes des cellules (Eming et *al.*, 2007).

• Médiateur inflammatoire

Les médiateurs inflammatoires sont les principaux acteurs qui vont médier les réponses inflammatoires, ainsi ils assurent un rôle majeur dans l'élimination du pathogène, qui sont sécrétés localement dans les tissus infectés (Freire and Van Dyke, 2013).

Ils sont répartis en diverses familles on peut citer :

- Les cytokines sont des molécules à faible poids moléculaire, ont une demi vie relative courte entre minutes et heures (J., 2013), ils sont répartis en différentes classes (interleukines, TNF, TGF et chimiokines) jouent un rôle important dans le recrutement des leucocytes vers le site d'infection, ou de blessure et dans la régulation des réponses inflammatoires (Chen et *al.*, 2018).

- Les protéines tel que : la protéine C réactive (CRP), l'haptoglobine, l'amyloïde sérique A, le fibrinogène (Chen et *al.* 2018). En plus on distingue des enzymes tel que le cyclooxygénase (cox), la NADPH oxydase (NOX) et la synthase inducible de l'oxyde nitrique (iNOS), ces médiateurs ont une fonction importante dans l'activation de plusieurs voies de signalisation et ainsi ces molécules peuvent servir de bio marqueur inflammatoires (Chen et *al.*, 2018).

Chapitre 1. Revue de littérature

• Système de complément

Le complément est un ensemble des protéines circulaires dans le plasma, il peut également exprimer sur les surfaces cellulaires fait partie de l'immunité innée, leur activation dépend trois voies : la voie classique, voie alternative et la voie de lectine. Ces derniers exercèrent différentes fonctions au cours de l'inflammation principalement dans la régulation du facteur tissulaire (J., 2013) .

1.1.4. Mécanisme de réponse inflammatoire

L'inflammation est largement connue comme une réponse protectrice de l'hôte contre divers pathogènes, cependant les mécanismes de réponse inflammatoire sont plus complexes en raison de leurs implications d'une variété de molécules immunologiques et divers mécanismes physiologiques (Netea et al., 2017). C'est une réponse en plusieurs étapes qui peut se résumer comme suit : les récepteurs du modèle de surface cellulaire qui reconnaissent les différents stimulants nuisibles; l'activation de la voie inflammatoire et le recrutement de cellules inflammatoires (Chen et al., 2018).

L'initiation de l'inflammation est médiée par plusieurs récepteurs de reconnaissance d'antigène : les PRR et les récepteurs de type TLR qui sont exprimés par les cellules immunitaires résidentes du tissu, *via* l'activation en aval de diverses voies de signalisation qui conduisent à la production de plusieurs médiateurs inflammatoires (Feehan and Gilroy, 2019). Les voies de signalisation inflammatoires qui contrôlent et régulent l'inflammation sont principalement : la voie MAP kinase, voie STAT / JAK et la voie de signalisation NF- κ B, ces voies ont un rôle important dans la régulation de l'expression de nombreux gènes inflammatoires : IL-1 β , TNF α , IL-6, et les chimiokines qui correspondent au déclenchement de différentes phases inflammatoires plus précisément la voie de NF- κ B qui joue un rôle pivot dans la production des cytokines pro-inflammatoires et dans la régulation de la mobilisation des cellules inflammatoires vers le site enflammé (Chen et al, 2018).

Chapitre 1. Revue de littérature

Ces médiateurs ont une fonction autocrine et paracrine qui changent le phénotype des cellules résidents comme les macrophages, afin de renforcer la production des protéines et des lipides inflammatoires et favorisent le recrutement des leucocytes vers le site d'infection (Villeneuve et *al.*, 2018).

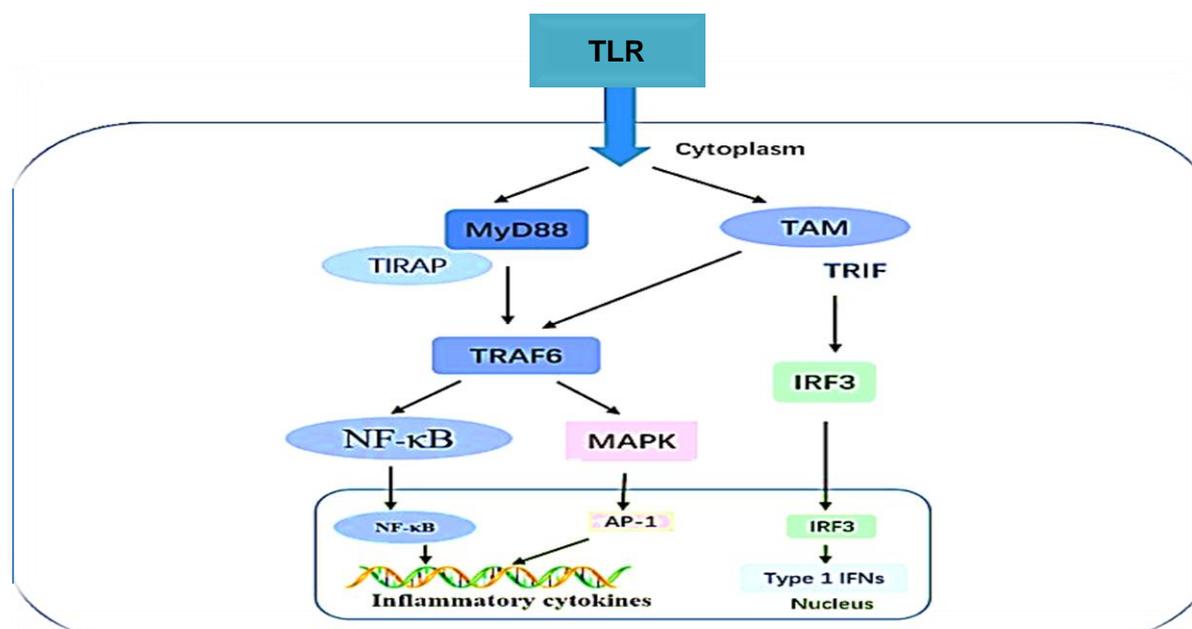


Figure1.2 .signalisation TLR ; La signalisation par TLR active la cascade de signalisation intra cellulaire qui conduit à la translocation nucléaire de AP-1 et NFKB ou IRF3 qui résulte la production d'une variété de cytokines inflammatoire(Chen et *al.*, 2018) .

De plus ces cytokines activent les cellules endothéliales pour faciliter l'extravasation du polynucléaires et neutrophiles vers le tissu infecté (Netea et *al.*, 2017), par la suite ces neutrophiles fonctionnent principalement dans l'élimination et la phagocytose des microorganismes par plusieurs mécanismes notamment par la production des molécules réactives de l'oxygène (Ros) ou par la libération des molécules extracellulaire comme les NETS (Feehan and Gilroy, 2019).

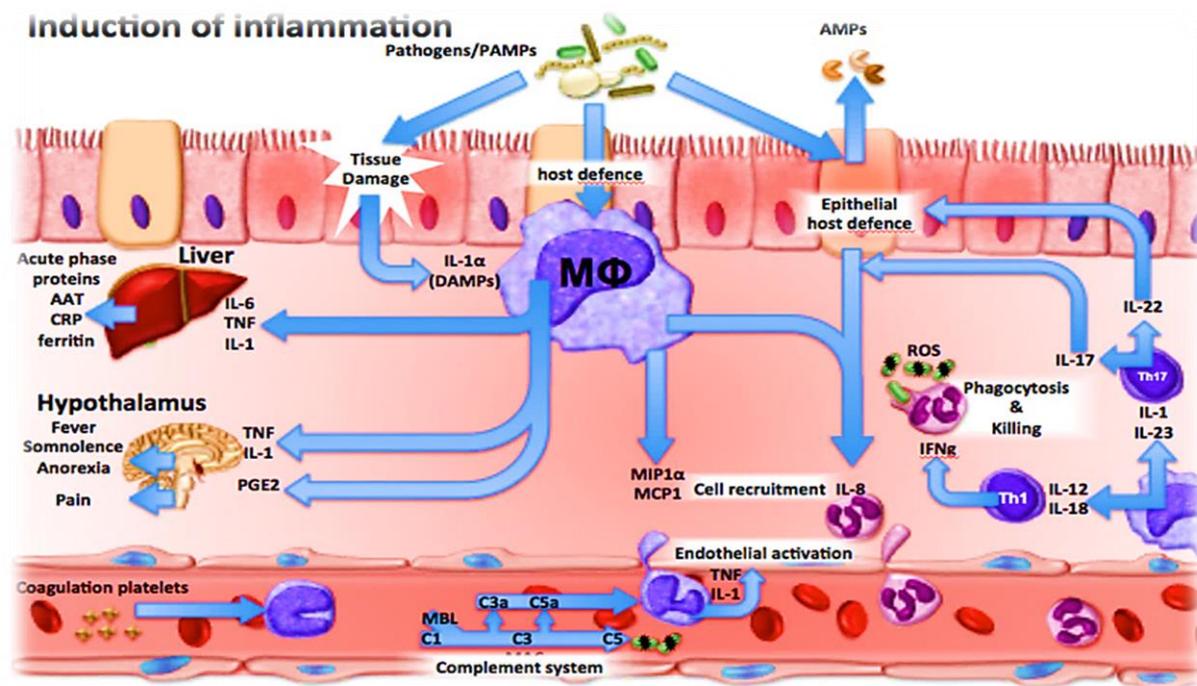


Figure1.3. Mécanisme de réponse inflammatoire : Les mécanismes immunologiques conduisant à l'induction d'une inflammation au cours des premières étapes de la défense de l'hôte contre les agents pathogènes envahisseurs. α 1-antitrypsine (AAT), profils moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP), peptides antimicrobiens (AMP), modèles moléculaires associés au danger (DAMP), complexe d'attaque membranaire (MAC), espèces réactives de l'oxygène (ROS), protéine C réactive (CRP), facteur de nécrose tumorale (TNF), interféron- γ (IFN- γ), lectine de liaison au mannose (MBL), macrophage ou monocyte (M ϕ), CC Motif Chimiokine Ligand (CCL). (Netea et al., 2017).

Par ailleurs, les composants de l'immunité adaptative vont être activés pour renforcer les réponses inflammatoires notamment les cellules T auxiliaires de type 1 (Th1) qui ont un rôle crucial dans l'amplification des réponses du neutrophile par l'intermédiaire de l'IFN γ et encore la sous population du LTh17 qui vont agir sur les cellules épithéliales pour stimuler la production des peptides microbiens comme les défensines par l'intermédiaire de l'IL-22, en plus ce microenvironnement inflammatoire stimule l'activation du système de complément afin d'induire l'opsonisation des pathogènes (Netea et al., 2017).

En conséquence, divers protéines de la phase aiguë sont produites pour déclencher les signes, les symptômes inflammatoires et aussi servent comme marqueurs inflammatoires (Netea et al., 2017).

Chapitre 1. Revue de littérature

1.2. Gène *NF-κB*

1.2.1. Généralité

L'abréviation de NF-κB signifie : facteur nucléaire de la chaîne kappa dans la cellule B (Mussbacher et al, 2019). Il a été identifié par Sen et Baltimore en 1986 (Fu et al, 2017), comme un facteur de transcription qui assure la liaison avec l'élément activateur de la chaîne léger kappa de l'immunoglobuline dans la cellule B activé (Hoesel and Schmid, 2013).

Le NF-κB est une transcription pléiotropie crucial (Cabrera et al, 2014), qui régule l'expression de nombreux gènes impliquant dans différent processus biologique: les réponses immunitaires innée et adaptative, l'inflammation, la croissance cellulaire, la survie, l'apoptose et même dans le développement des cancers (Zhang and Sun, 2015).

Chez les mammifères ils existent cinq membres de la famille du NF-κB qui ont été identifié : c Rel; Rel B; p65 (Rel A); p50 / p105 et p52 / p100 (Fu et al, 2017), qui sont codées par cinq gènes respectivement (*C REL*, *RELB*, *REL A*, *NF-κB1*, *NF-κB2*) (Dimitrakopoulos et al, 2018).

• Gène *NF-κB 1*

Le gène *NF-κB1* humain couvrant 156 Kb est situé sur le chromosome 4q23q24, est composé de 24 exons introns variant entre 40000 et 323 pb de longueur (Kuba et al, 2020).

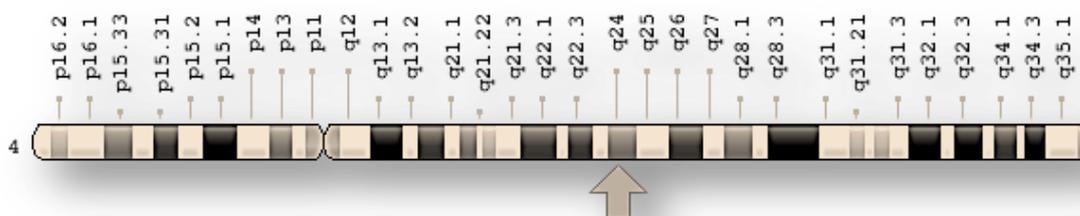


Figure 1.4. Localisation du gène *NF-κB1* selon NCBI.

Chapitre 1. Revue de littérature

Le *NF- κ B1* code pour deux protéines (Kuba et al., 2020) :

- Une protéine de 105 KDa qui n'assure pas la liaison avec l'acide nucléique désoxyribose.
- Une protéine cytoplasmique de 50 KDa qui correspond à l'extrémité N-terminal de p105 est liée avec l'ADN.

Au niveau du gène *NF- κ B1* ont identifié plusieurs variantes les plus connus sont :

rs 7269119 (C>G), rs28362491 (- 94 insertion / délétion ATTG), rs468068 (A >G) et rs 12509517 (G> C); parmi eux le polymorphisme le plus étudié c'est le polymorphisme ATTG d'insertion / suppression -94 du *NF- κ B1* (rs 28362491) (Dimitrakopoulos et al., 2018), car ce dernier a lieu au promoteur du gène *NF- κ B1* qui est responsable à la production de la sous unité p50/ p105 ce qui entraîne la modulation de la transcription, la production et la fonction de cette sous unité (Li and Zhang, 2019).

• Gène *NF- κ B 2*

Ce gène est localisé sur le chromosome 10q24 est codé pour la protéine (p100) et la protéine (p52) (Sun and Zhang, 2007).

• Gène *RELA* ou *NF- κ B3*

Ce gène est cartographique sur le chromosome 11q12q13 est composé de 10 exons, il est responsable à la production de la sous unité P65 (Sun and Zhang, 2007).

• Gène *RELB*

Ce gène est situé sur le chromosome 19 et code pour la production de la protéine Rel (Sun and Zhang, 2007) .

• Gène *C REL*

Ce gène est cartographique sur le chromosome 2p13p12 et code pour la sous unité c Rel (Sun and Zhang, 2007).

1.2.2. Protéine NF- κ B

Le facteur de transcription NF- κ B n'est pas un facteur unique comme leur nom indique (Mussbacher et al, 2019), c'est un thème collectif désignant cinq sous unités protéiques : P52 / p100, p50 / p105, p65 (RelA), Rel B, c Rel construisant un ensemble des homo ou hétéro dimères (Jimi et al, 2019), qui ont un rôle important dans la régulation d'une variété de processus physiologiques et pathologiques (Wang et al, 2017).

Chapitre 1. Revue de littérature

Dans les cellules en repos le NF- κ B est séquestré dans le cytoplasme sous forme d'un complexe inactive en association avec une famille de protéine inhibitrice appelé IKBS (Wang et al, 2017). Cette dernière contient un ensemble de molécules inhibitrices qui sont I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ (Jimi et al, 2019). Ces inhibiteurs sont caractérisés par des répétitions d'ankyrine qui interagissent avec les domaines de la liaison de NF- κ B à l'ADN afin d'empêcher cette liaison (Hoesel and Schmid, 2013).

Pendant, lors d'une stimulation le NF- κ B est dissocié de l'I κ Bs et transloquer dans le noyau ou il se lie aux régions promotrices des gènes cibles afin de réguler leur transcription (Wang et al, 2017).

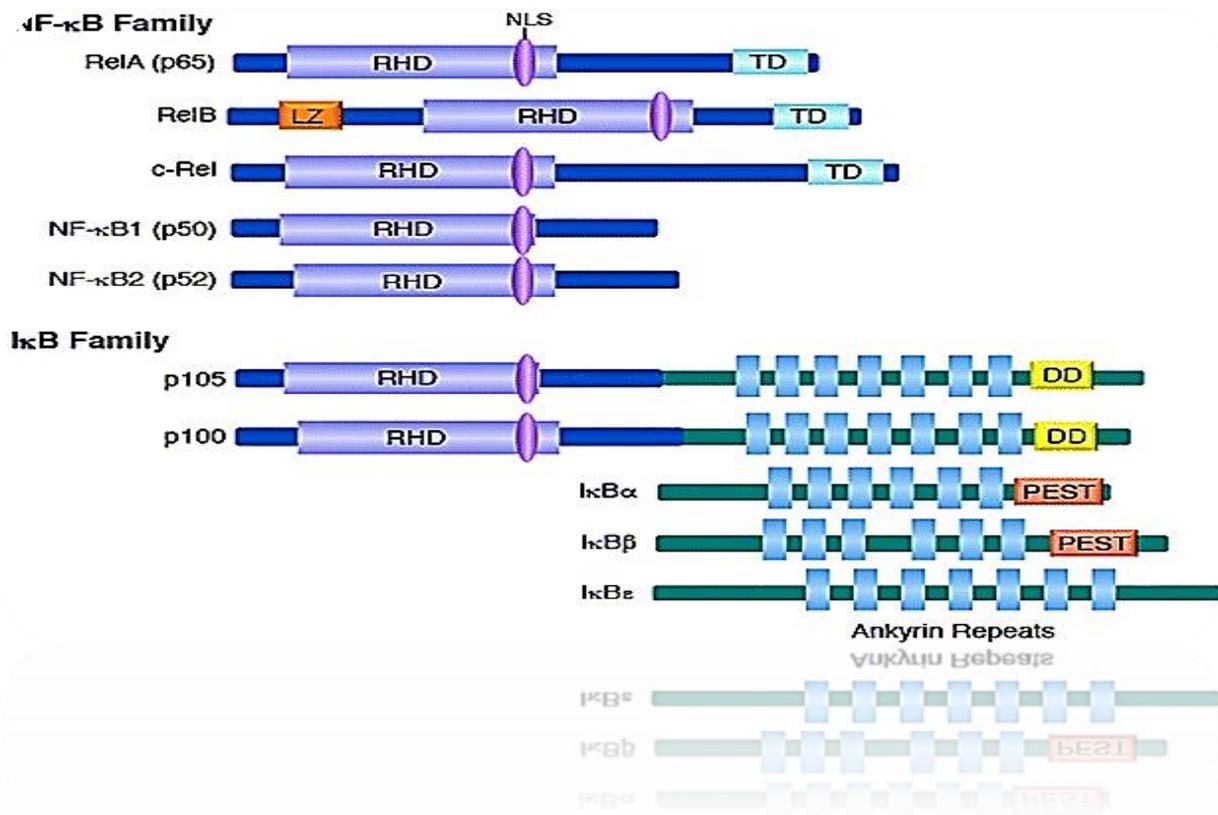


Figure1.5. les familles de NF- κ B et I κ B : Les cinq membres de la famille NF- κ B sont schématisé avec les domaines principaux : le domaine Rel homologie (RHD) qui assure la médiation des fonctions de liaison à l'ADN et de dimérisation de transactivation (TD) qui est requise pour l'activation transrationnelle des gènes cibles , tandis que le motif leucine zipper est également impliqué dans la transactivation du gènes cible . La famille I κ B de la protéine précurseur p50 et p105, I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ sont caractérisé principalement par la répétition d'ankyrine qui sont nécessaire pour l'inhibition de NF- κ B : le domaine de mort (DD) de p105 et p100 est également important pour les fonctions de types I κ B. La séquence de type PEST (proline, glutamine, sérine et thréonine) de I κ B α et I κ B β intervient dans le renouvellement des protéines (Zhang and Sun, 2015) .

Chapitre 1. Revue de littérature

Les cinq sous unités protéiques partagent un domaine commun appelé le domaine d'homologie Rel (RHD) responsable à la dimérisation et à la liaison avec l'ADN.

Chaque sous unité entre eux héberge des domaines structurelles spécifiques (Zhang and Sun, 2015).

Les deux sous unités protéiques de NF- κ B1 et de NF- κ B2 sont synthétisées en tant que précurseur p105 et p100 et sont traitées protéolytiquement par des protéases en p50 et p52 respectivement (Hoesel and Schmid, 2013), elles possèdent des domaines inhibitrices riches en ankyrine qui bloquent la liaison à l'ADN et empêchent la translocation nucléaire, en plus ces deux membres dépourvus des domaines de transe activation ce qui les permet de agir comme des Répresseurs transcriptionnelles donc, ils doivent dimériser avec les autres membres de NF- κ B pour les activer (Mussbacher et al, 2019).

Les différents protéines Rel (Rel A, Rel B, Rel c) possèdent un domaine trans-activation au niveau de C- terminal qui est responsable à la transcription des gènes cible avec des molécules inhibitrices de p100 et p105 (Mussbacher et al, 2019).

1.2.3. Voie de signalisation de NF- κ B

La voie de signalisation NF- κ B est l'une des voies les plus importantes impliquées dans la régulation de nombreuses réponses inflammatoires et immunitaires (Meng et al, 2020).

En réponse à de nombreux signaux de l'environnement (tel que les cytokines pro-inflammatoires, les agents pathogène, les dommages d'ADN et le stress oxydatif) les protéines de NF- κ B vont transloquer vers le noyau et déclencher la transcription de plusieurs gènes (Zhao et al, 2018).

Depuis lors des études on classe l'activation de NF- κ B : en voie canonique (classique), voie non canonique (alternative) et des voies de signalisation atypiques (sont induit par des dommages d'ADN) (Mussbacher et al, 2019). Ces voies sont différencie à la fois dans les mécanismes de signalisation et dans l'effet biologique (Sun, 2017).

Chapitre 1. Revue de littérature

• Voie canonique (classique)

L'activation de la voie canonique dépend de divers stimulant extracellulaire: les composants microbiens LPS, les cytokines pro-inflammatoires(TNF α , IL-1 β) (Mussbacher et al., 2019), elle peut activer aussi par plusieurs signaux des récepteurs tel que TLR et PRR (Sun, 2017).

Après une stimulation, la voie canonique dépend l'activation de complexe kinase IKK qui est composé de plusieurs sous unité (IKK α , IKK β , IKK γ / NEMO), la principale kinase qui caractérise cette voie c'est la sous unité IKK β leur activation nécessite une phosphorylation induite par une kinase 1 activé par TGF β (TAK1) un membre de la famille MAP kinase, ensuite la sous unité IKK β sert à la phosphorylation de la sous unité IKB α ou bien phosphoryle la protéine p105 au niveau de l'extrémité C- terminal (Zhang and Sun, 2015).

Ce qui provoque leurs dégradation par le système ubiquitine protéome (Jimi et al., 2019), ce qui entraîne une translocation nucléaire rapide des membres canoniques de NF- κ B particulièrement les dimères p50 / Rel A et p50 / c Rel (de Jesús and Ramakrishnan, 2020).

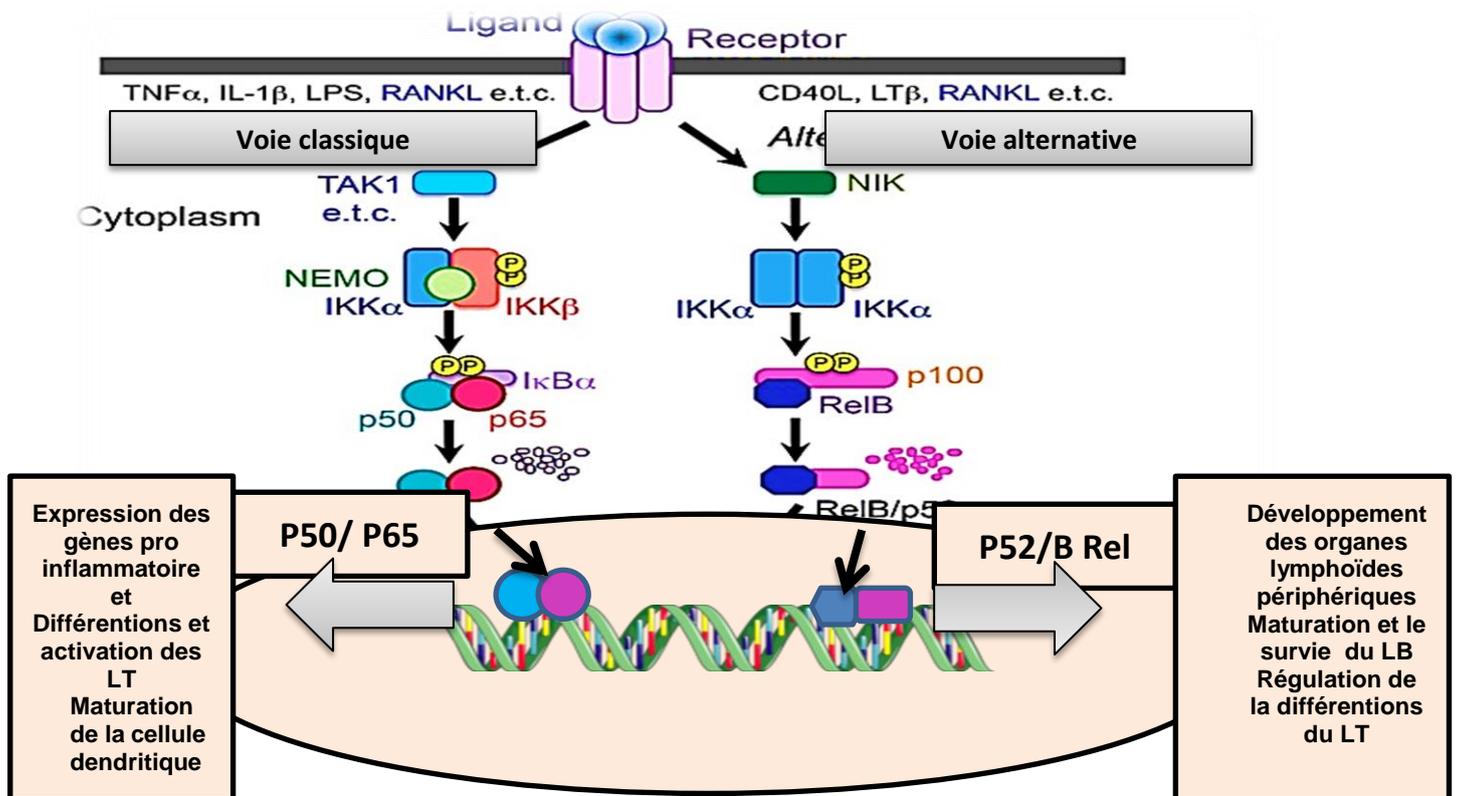


Figure 1.6 : voie de signalisation de NF κ B. La voie classique (canonique) (à gauche) est activée par un grand nombre d'agonistes, tels que le TNF- α , l'IL-1, le lipopolysaccharide et les récepteurs des cellules T. L'activation de cette voie dépend du complexe I κ B kinase (IKK) (IKKEMO), qui phosphoryle I κ B α (Ser32, 36) pour induire une dégradation rapide. Cette voie est essentielle pour les réponses immunitaires, l'inflammation, la tumorigenèse et la survie cellulaire. La voie alternative (non canonique) (à droite) est activée par un nombre limité d'agonistes, qui sont impliqués dans l'organogenèse lymphoïde secondaire, la fonction des lymphocytes B matures et l'immunité adaptative. Cette voie nécessite NIK et IKK α , qui induisent le traitement lent de p100 pour générer p52, résultant en la dimérisation et l'activation de l'hétérodimère p52 / RelB. L'activateur du récepteur du ligand NF- κ B (RANKL) active les voies classiques et alternatives (Jimi et al., 2019).

• **Voie non canonique**

La voie de signalisation alternative du NF- κ B intervient dans l'activation du dimère p52 / RelB, qui joue un rôle majeur dans la régulation de plusieurs processus immunologiques notamment dans le développement des organes lymphoïdes périphériques, la survie des cellules B et la maturation des cellules dendritiques, la différenciation des cellules épithéliales thymiques et enfin dans la régulation de la différenciation des lymphocytes T (Sun, 2012). La stimulation de cette voie repose essentiellement sur un sous ensemble du ligand du membre de la super famille du facteur de nécrose tumorale TNF notamment les lymphotoxine B; CD 40 L, RANKL (Liu et al., 2017).

Chapitre 1. Revue de littérature

Ces dimères conduisant aux déclenchement d'une cascade de signalisation dépend principalement de la kinase inductrice (NIK) qui est activée et coopéré fonctionnellement avec le IKK α pour induire la phosphorylation des résidus de sérine de l'extrémité C-terminal de p100, ce qui provoque par la suite leurs dégradations à l'aide d'une ligase d'ubiquine E3 menant à la génération de la protéine 52 et la translocation nucléaire du dimère p52 / Rel B (Liu et *al.*, 2017).

Tableau1.2 : Activateurs importants de NF- κ B

Classe d'activateur	Exemples
Cytokines	Il-1 β , TNF α , IL-12, IL-17, IL-33, Lymphotoxin- β , GM-CSF.
Ligands récepteurs	CD40L, BAFF, ligand CD4 [VIH-gp120, TRAIL ; FasL), BMP-2 et -4, EGF, HGF, insuline.
Les bactéries	Lipopolysaccharide [LPS]), flagelline, CpG-ADN, entérotoxines
Virus	ARNdb via PKR, de nombreuses protéines virales
Parasites eucaryotes	Candida albicans, Entamoeba histolytica, Leishmania
Produits de lyse cellulaire	DAMPs [Motifs moléculaires associés au danger, HMGB1, ADN extracellulaire, ARN extracellulaire
Stress physiologique	Contrainte ER, écoulement turbulent (contrainte de cisaillement), pH acide, stress oxydant hyperglycémie
Stress physique	Rayonnement ionisant, lumière UV, froid.
Protéines modifiées	Produits finaux de glycation avancée (AGE), LDL oxydé, fragments de protéines amyloïdes

Chapitre 1. Revue de littérature

1.2.4. NF- κ B et l'inflammation

L'inflammation est un mécanisme de l'immunité innée en réponse aux différents facteurs (physique, physiologique et oxydative); caractérisé par l'enchaînement de multiples réactions qui sont contrôlées et régulées par divers voies de signalisation (Hoesel and Schmid, 2013).

D'une part, plusieurs études montrent le rôle central de système NF- κ B dans l'orchestration des réponses inflammatoires (de Jesús and Ramakrishnan, 2020), en raison à Sa capacité d'induire l'expression d'un large éventail des gènes pro-inflammatoires dans les cellules de l'immunité innée afin d'amplifier l'inflammation et encore ils sont constaté que la signalisation de NF- κ B sert à la régulation de plusieurs processus cellulaire Tel que la survie, l'activation et la différenciation de nombreuses cellules pro-inflammatoires (Liu et al, 2017).

1.2.4.1. Rôle de NF- κ B dans l'expression des gènes pro inflammatoire

La signalisation du facteur de transcription NF- κ B joue un rôle majeur dans la modulation de l'expression inductible des gènes inflammatoires pendant la réponse immunitaire pour maintenir l'équilibre et l'homéostasie immunitaire (Bhatt and Ghosh, 2014).

Ce dernier est obtenu grâce aux réponses des cellules à une large gamme de cytokine et d'autres stimulant qui vont déclencher une cascade de signalisation intra cellulaire qui dépendent de l'activation du facteur de transcription NF- κ B qui assure sa liaison avec les promoteurs des gènes cibles (Bhatt and Ghosh, 2014). Ces gènes codent pour plusieurs cytokines pro-inflammatoires (IL-1 , IL-2 , IL-6 , TNF α) et des chimiokines (IL-8 , MIP1 α , MCP1) (Yahfoufi et al., 2018), qui vont participer à la régulation de la phase effectrice de l'inflammation et à l'amplification de l'activation du NF- κ B (Mussbacher et al., 2019) .

Un autre ensemble des gènes ciblés par le NF- κ B : sont les molécules d'adhésion qui vont permettre la transmigration et le recrutement des leucocytes vers les sites inflammatoires, en outre le NF- κ B stimule l'expression de divers enzymes qui peuvent amplifier l'inflammation: la cyclooxygénases et la lipoxygénase catalysant la formation de nombreux médiateurs inflammatoires comme les prostaglandines, leucotriènes et ainsi le NO synthèse, ces derniers jouent un rôle majeur dans la régulation de la pression artérielle et la vasodilatation (Mussbacher et al., 2019).

Chapitre 1. Revue de littérature

Enfin le NF- κ B participant à la régulation des gènes anti-apoptotiques dans le contexte du stress physiologique pour favorisent la survie cellulaire (Hoesel and Schmid, 2013).

Tableau1.3 : Gènes cibles importants de NF- κ B.

Classe d'activateur	Exemples
Cytokines, chemokines	IL-1 α and - β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, TNF α , IFN β , IFN γ , CCL5, Fractalkine, Gro.
Récepteurs immunitaires	CCR5, CCR7, CD3, CD23 (Fc ϵ RII), CD40, CD137, MHC I, Nod2, TCR, TLR9, TNFR2, TREM-1
Autres récepteurs	A2A, récepteur d'adénosine ; α 2B , EGFR , RAGE
Molécules d'adhésion	E-selectin, ICAM-1, fibronectin, P-selectin, VCAM-1
Proteins de phase ague	CRP, PTX3, serum amyloid A
Coagulation	Facteur tissulaire [F3, F VIII, uPA, PAI-1
Gènes anti-apoptotiques	A20, A1 Bcl-2, c-FLIP c-IAP1 and-2, BIRC3, XIAP, TRAF1 et TRAF2

1.2.4.2 Activation de NF- κ B dans les cellules inflammatoire

Les cellules de l'immunité innées sont les principaux acteurs qui médient l'inflammation, car ces cellules expriment les différents récepteurs de reconnaissance d'antigène PRR (Liu et *al.*, 2017). Lors de leur stimulation par des composants microbiennes ces récepteurs déclenchent un événement de signalisation commun des PRR ciblent l'activation de la voie canonique du NF- κ B pour induire l'expression de divers cytokines pro-inflammatoire: (IL-1, TNF α , IL-6) qui sont responsable à la régulation de nombreux processus principalement dans la transmigration des polynucléaires et dans l'activation et la différenciation de la population du LT (Zhang and Sun, 2015).

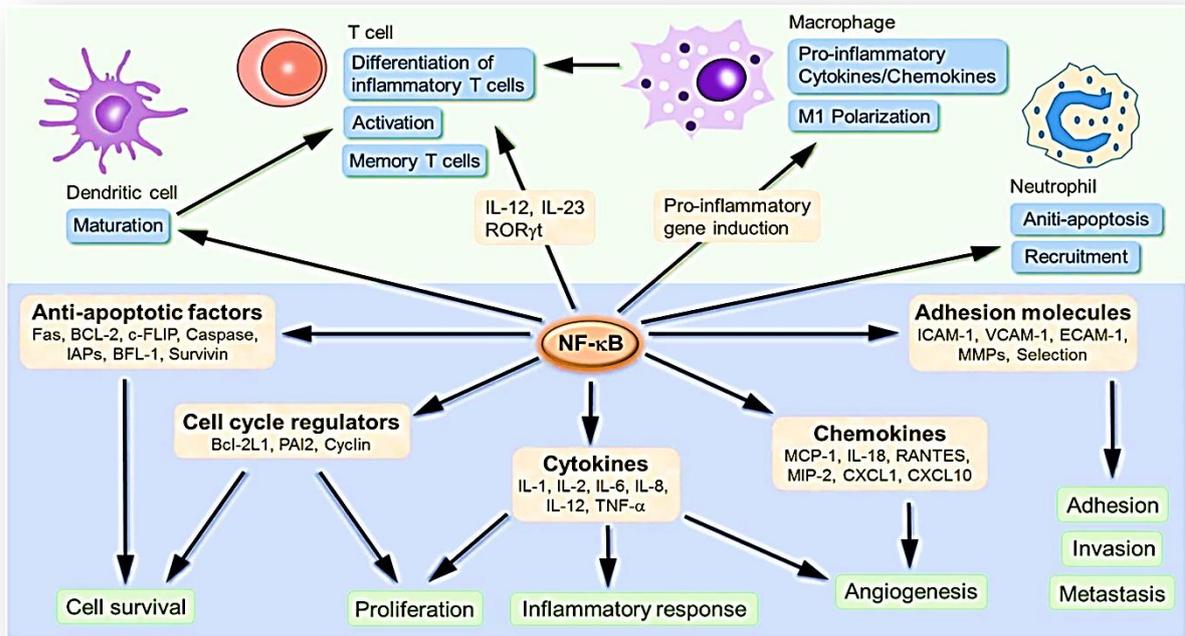


Figure 1.7. Les gènes cibles NF-κB impliqués dans le développement et la progression de l'inflammation : NF-κB est un facteur de transcription inductible. Après son activation, il peut activer la transcription de divers gènes et ainsi réguler l'inflammation. NF-κB cible l'inflammation non seulement directement en augmentant la production de cytokines inflammatoires, de chimiokines et de molécules d'adhésion, mais également en régulant la prolifération cellulaire, l'apoptose, la morphogenèse et la différenciation (Liu et al., 2017).

Des études montrent que chaque type de cellule a une réponse spécifique à l'activation de NF-κB, en raison de la signature épigénétique de la cellule (Gasparini and Feldmann, 2012).

•Macrophage

Plus récemment il ont été révélé que le NF-κB renforce l'activité pro-inflammatoire du macrophage par l'intermédiaire de l'activation de la voie de signalisation du récepteur TLR (Liu et al., 2017), cette dernière découle l'activation de plusieurs protéines tel : que MYD et TRIR qui vont stimuler l'activité de NF-κB, et résultent l'induction d'un grand nombre du gène pro-inflammatoires qui codent pour TNFα, IL-1β, IL-12 p40 et la cyclooxygénase qui ont un rôle essentiel dans la polarisation du macrophage vers le profil pro-inflammatoire M1(Wang et al.,

Chapitre 1. Revue de littérature

2014). Ainsi cette voie de signalisation résulte l'induction d' IFN de type I (IFN α , IFN β) dans les macrophages (Liu et *al.*, 2017).

• Cellules dendritiques

Des études récentes montrent l'importance des protéines du facteur de transcription NF- κ B et ses composants de signalisation (IKK2 , NIK) dans la production des différents chimiokines et cytokines qui sont responsables de la migration des cellules dendritiques vers les organes lymphoïdes secondaires (Gasparini and Feldmann, 2012). Dans le but de favoriser sa maturation et pour stimuler les réponses inflammatoires du LT (Sun, 2017).

• Population du LT

Plusieurs chercheurs établissent le rôle du NF- κ B dans l'activation des cellules T naïves par l'intermédiaire de leurs sous-unités Rel A et la sous-unité c Rel qui exercent une fonction importante dans l'initiation de la signalisation du TCR pour mener à l'activation du LT naïve (Shi and Sun, 2015).

De plus, il a été montré l'importance de l'activité de NF- κ B dans la différenciation du LT CD4 en différentes populations (LTh1 et LTh17) par la production des cytokines IL-12 et IL-23 respectivement dans les cellules immunitaires pour favoriser leur différenciation et ainsi il a été établi que le NF- κ B stimule également l'induction de l'expression du gène qui code pour le facteur de transcription de la lignée TH17 le ROR γ qui participe à la différenciation du LTh17 (Zhang and Sun, 2015).

Des travaux ultérieurs montrent le rôle de NF- κ B particulièrement la sous-unité c Rel dans le développement du LT reg par l'induction du facteur de transcription FOXO3, en plus il a constaté le rôle de la sous-unité p50 dans l'expression du facteur de transcription GATA3 pour la régulation des réponses du Th2 dans l'inflammation allergique des voies respiratoires (Shi and Sun, 2015).

Chapitre 1. Revue de littérature

1.2.4.3 Le rôle du NF- κ B dans la résolution de l'inflammation

Des recherches récentes ont découvert une autre facette de la NF- κ B c'est la double fonction dans la modulation à la fois l'inflammation et la résolution de l'inflammation, cette double fonction s'assure par l'expression différentielle des sous unité de NF- κ B dans les différent phases d'inflammation (Muxel et *al.*, 2016).

L'hétéro dimère P65 / P50 est la forme prédominant de NF- κ B fonctionnellement active dans les activités pro inflammatoires, en revanche l'hétéro dimère P50 / cRel ; P65 / cRel ou l'homo dimère P50 / P50 ont exercé des effet anti-inflammatoires et pro résolution impliquant la transcription des gènes qui permettre la polarisation des cellules immunitaires vers le profile anti-inflammatoires(Sugimoto et *al.*, 2016) .

En plus l'homo dimère P50 / P50 est dépourvu du domaine de trans activation, il permet de réprimer l'expression des gène pro-inflammatoire comme le TNF(Muxel et *al.*, 2016).

En outre, il a été révélé que le NF- κ B favorise l'induction de l'apoptose leucocytaire pendant la résolution de l'inflammation par l'intermédiaire de l'expression des gènes qui codent pour les molécules pro-apoptotiques(Lawrence and Fong, 2010).

Chapitre 1. Revue de littérature

1.2.4.4 NF- κ B et les maladies inflammatoires

Les polymorphismes qui encadrent le gène *NF- κ B* sont à l'origine du développement de plusieurs maladies inflammatoires notamment la colite ulcéreuse, la maladie de Crohn, polyarthrite rhumatoïde, le diabète de type 1, sclérose en plaque ainsi que la sensibilité à plusieurs cancers (Sun and Zhang, 2007).

Ces derniers sont caractérisés par une activation successive des voies de signalisation de NF- κ B dans les différents types des cellules immunitaires. Ce qui entraîne une production aberrante des chimiokines et des cytokines pro-inflammatoires qui favorise le recrutement des cellules immunitaires et à l'amplification de l'inflammation, ce qui provoque par la suite des lésions tissulaires excessives qui conduit aux développements de diverses maladies (Sun, 2017).

En outre, le dérèglement du NF- κ B dans les cellules T peut induire le développement de diverses maladies auto-immunes (Sun et al, 2013).

1.2 .PCR (polymerase chain reaction)

1.2.1. Définition

La réaction de polymérisation en chaîne quantitative est connue par le nom PCR, c'est une technique biologique moléculaire sensible (Rinttilä et al, 2020). Il a été décrit en 1985 par Karl Mullis (Lorenz, 2012) .Elle sert à la synthèse, la quantification et à la détection d'un acide nucléique dans un échantillon considéré avec une rapidité et précision (Ahrberg et al, 2016). Ce processus largement utilisé dans les domaines de diagnostic clinique: des agents pathogènes, des maladies génétiques et dans les domaines de recherche (Mackay, 2002).

1.2.2. Principe

PCR est un ensemble de réaction chimique complexe qui permet de générer une grande quantité d'un segment spécifique d'ADN à partir d'une matrice d'ADN ou séquence cible (Nogva and Rudi, 2004). Ce procédé utilise une amorce spécifique ou une paire d'oligonucléotide synthétique pour chaque brin d'ADN double brin afin de démarrer la synthèse des séquences complémentaires à l'aide d'une enzyme d'ADN polymérase, par conséquent elle permet la génération des milliards copies de cette séquence (Valones et al, 2009).

Chapitre 1. Revue de littérature

1.2.3. Etapes

La réplication in vitro de l'acide désoxyribonucléique se fait par la réaction de PCR qui est assurée par un cyclage thermique qui peut être résumé en trois étapes (Ahrberg et *al.*, 2016).

- **Etape 01** : la dénaturation de l'ADN doubles brin à température de 95C °, afin de séparer et ramper les liaison hydrogène entre les deux brins d'ADN (Ahrberg et *al.*, 2016).

- **Etape 02** : l'hybridation des brins d'ADN cible avec deux amorces à une température 55 C ° à 65C °.

- **Etape 03** : l'élongation et la synthèse d'un nouveau brin complémentaire par Tac polymérase cette étape nécessite une température de 70 C °- 80 C °(Lorenz, 2012).

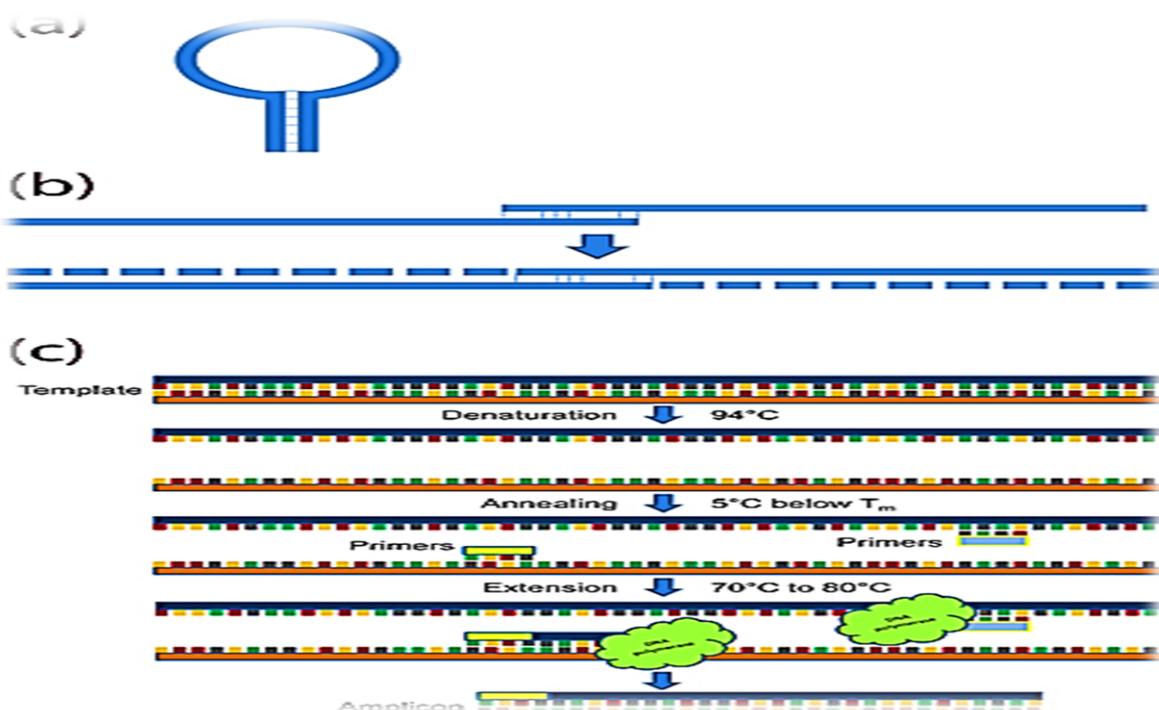


Figure1.8. Etapes d'amplification par PCR d'une ADN cible.

Chapitre 1. Revue de littérature

Chaque cycle est composé de 25 à 35 tours et la température de chaque cycle dépend de la taille de la matrice et la teneur de GC de l'ADN (Lorenz, 2012).

1.2.4. Acteurs de PCR

Les réactifs de PCR comprennent :

- **L'acide nucléique** : généralement bi-caténaire et il contient la séquence cible (Lorenz, 2012).
- **Deux amorces, sens et anti sens** : ces oligonucléotides sont spécifiques pour le gène cible (Lorenz, 2012).
- **Enzyme** : la Taq polymérase est une ADN polymérase thermorésistante dérivée de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus* elle sert à la synthèse d'un brin complémentaire *via* l'addition séquentielle de désoxynucléotide (Mackay, 2002).
- **Désoxynucléotides tri phosphates (dNTPs)** : sont des : dGTP, dATP, dTTP, dCTP qui assurent une mémoire pour la Taq polymérase afin de synthétiser le nouveau brin d'ADN (Mackay, 2002) .

1.2.5. Choix d'amorce

Le choix des amorces appropriées pour le gène cible c'est une étape importante pour le succès de la PCR, la connaissance du choix de la bonne amorce fait par un paramètre essentiel appelé la conception des amorces (Lorenz, 2012).

Ce dernier est basé sur l'utilisation de nombreux programmes informatiques pour concevoir et sélectionner les bonnes paires d'amorces, on distingue : le programme Gen Bank du National Center for Biotechnology Information NCBI qui permet de donner la séquence du gène d'une espèce appropriée et le programme de recherche d'alignement local de base (Primer-BLAST) qui va permettre de confirmer la spécificité d'oligonucléotide (Rinttilä et al., 2020).

Chapitre 1. Revue de littérature

Cependant plusieurs facteurs devraient être considérés lors de la conception des amorces les plus important sont (Lorenz, 2012) :

- Longueur de l'amorce qui doit être entre 15 à 30 résidus nucléotidiques.
- L'amorce doit être contient un bon pourcentage de G-C 40 %.
- L'absence de complémentarité entre l'amorce sens et anti sens afin d'évité la formation de structure d'épingle à cheveux.
- La température pour les deux amorces ne dépasse pas plus de 5 C °.

Chapitre 1. Revue de littérature

1.3. Problématique

Inflammation est une réponse du système immunitaire à des stimulants nocifs tels que les agents pathogènes, les cellules endommagées et les composants toxiques dans lesquelles il y a la transmigration des cellules périphériques du sang vers le site inflammatoire et l'activation des cellules résidentes du tissu infecté afin de produire des différents médiateurs comme les cytokines et les chimiokines, qui vont médier et réguler les diverses phases d'inflammation. Par ailleurs, plusieurs études montrent que ce processus est corrélé avec l'expression accrue du facteur de transcription NF- κ B notamment la sous-unité P50 qui est codée par le gène *NF- κ B1*, ce qui suggère fortement l'association du gène *NF- κ B1* avec le processus inflammatoire.

Dans ce travail nous essayons d'impliquer la conception d'amorce du gène *NF- κ B1* dans le but de l'amplifier dans des futures études par plusieurs techniques de la biologie moléculaire notamment la PCR, afin d'étudier et souligner les différents niveaux d'expression de ce gène dans les diverses phases d'inflammation.

1.4. Objectif

Réalisation d'une séquence d'oligonucléotides qui servira d'une amorce pour une PCR.

1.5. But

Comprendre à concevoir des amorces spécifiques au gène *NF- κ B1* qui sont impliquées au processus inflammatoire.

Chapitre 2. Matériels et Méthodes

2.1. Conception des amorces

La conception d'amorce c'est une étape clé de la PCR car ces oligonucléotides sont nécessaires pour démarrer la réplication et l'amplification de la séquence d'ADN cible lors d'une PCR (Starks et *al.*, 1976) .

En effet cette étape sert à fixer et déterminer plusieurs paramètres importants dans la réaction de la PCR : la position, la température de fusion et enfin la longueur du produit.

Donc, une amorce mal conçue peut influencer sur les résultats et le fonctionnement de la PCR.

Par ailleurs, pour une PCR optimal on souligne certaines règles de bases dans la conception d'amorce les plus important sont (Lorenz, 2012) :

- **Longueur d'amorce**

Dans une PCR le temps d'hybridation et la température dépend de la longueur de l'amorce donc, il est nécessaire que la taille de l'amorce doivent être entre 18 et 24 paires de bases.

- **Température de fusion**

Il est nécessaire de compte la température de fusion des amorces et qu'il doit être la même température pour l'ensemble d'amorces afin que l'élongation des amorces se fassent optimale (Higgins et *al.*, 2019).

- **Spécificités et complémentarités d'amorce**

Les amorces doivent être spécifiques de la région que vont amplifier et qui n'ont aucun homologie intra amorce ou inter amorce, car elles peuvent former des structures doubles brin (épingle à cheveux) qui entraîne par la suite une perturbation de l'hybridation (Jiang et *al.*, 2018).

Chapitre 2. Matériels et Méthodes

- Teneur en C/G

Les amorces devraient être composées de 50% de CG pour une hybridation optimale et spécifique, par contre si l'amorce est riche par les suites poly G ou les suites poly C l'efficacité de l'amplification peut réduire.

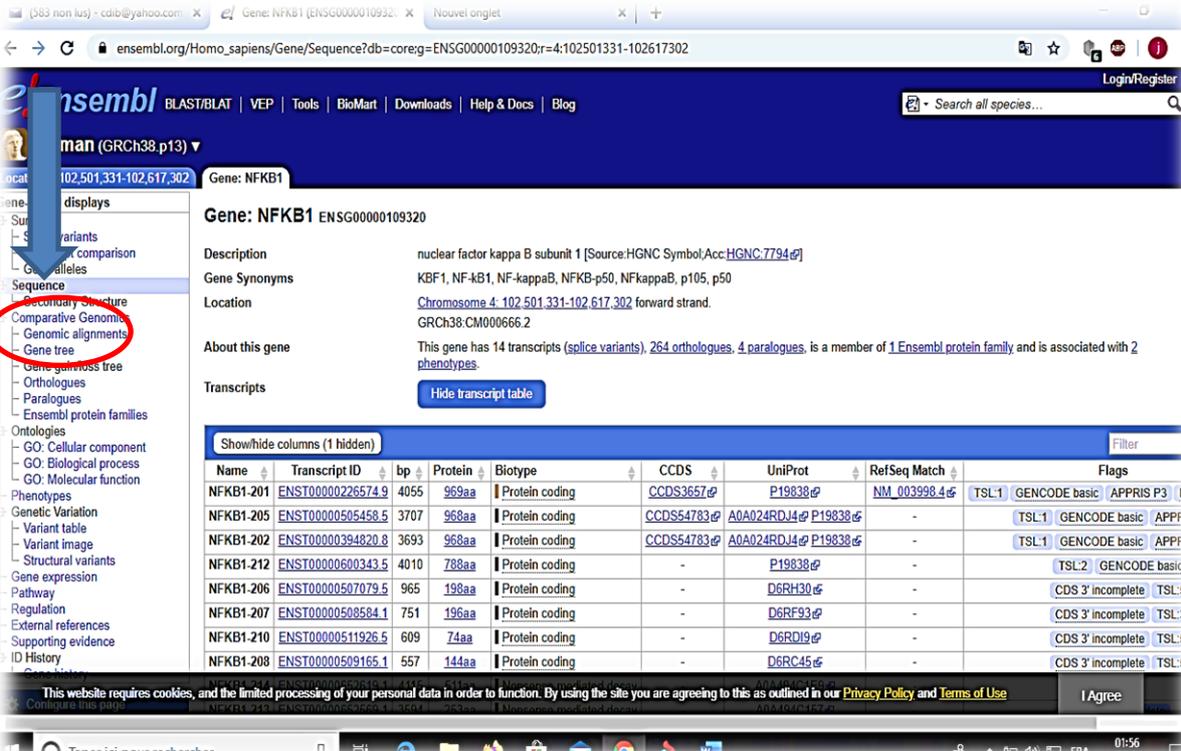
- Séquence à l'extrémité 3'

La mise en œuvre de l'extrémité 3' des amorces PCR est essentielle pour minimiser le processus de désamorçage, car elle permet la formation des liaisons d'hydrogène plus fortes entre les résidus CG et ainsi d'éviter le phénomène de complémentarité.

2.2. Conception d'amorces du gène *NF-κB1*

2.2.1. Recherche de la séquence de référence du gène *NF-κB1*

La conception des amorces encadrant le gène *NF-κB1* recourt d'abord à la recherche de leur séquence à partir de la base de données « Ensembl » via le site « www.Ensembl.org ». Comme est montré dans la figure 9.



The screenshot shows the Ensembl genome browser interface for the gene *NFKB1* (ENSG00000109320). The left sidebar has the 'Sequence' tab selected, with 'Comparative Genomics' and 'Genomic alignments' highlighted. The main content area displays the gene's description, synonyms, location, and a table of transcripts. The table includes columns for Name, Transcript ID, bp, Protein, Biotype, CCDS, UniProt, RefSeq Match, and Flags.

Name	Transcript ID	bp	Protein	Biotype	CCDS	UniProt	RefSeq Match	Flags
NFKB1-201	ENST00000226574.9	4055	969aa	Protein coding	CCDS3657	P19838	NM_003998.4	TSL:1 GENCODE basic APPRIS P3
NFKB1-205	ENST00000505458.5	3707	968aa	Protein coding	CCDS54783	A0A024RD14	P19838	TSL:1 GENCODE basic APPRIS P3
NFKB1-202	ENST00000394820.8	3693	968aa	Protein coding	CCDS54783	A0A024RD14	P19838	TSL:1 GENCODE basic APPRIS P3
NFKB1-212	ENST00000600343.5	4010	788aa	Protein coding	-	P19838	-	TSL:2 GENCODE basic
NFKB1-206	ENST00000507079.5	965	198aa	Protein coding	-	D6RH30	-	CDS 3' incomplete TSL:5
NFKB1-207	ENST00000508584.1	751	196aa	Protein coding	-	D6RF93	-	CDS 3' incomplete TSL:3
NFKB1-210	ENST00000511926.5	609	74aa	Protein coding	-	D6RD19	-	CDS 3' incomplete TSL:5
NFKB1-208	ENST00000509165.1	557	144aa	Protein coding	-	D6RC45	-	CDS 3' incomplete TSL:5

Figure 2.1. Plateforme de la base de données Ensembl.

Chapitre 2. Matériels et Méthodes

La figure (2.10) montre la séquence du gène *NF- κ B1*, les caractères en rouge représentent les parties codon (exon) tandis que les parties en noire représentent les parties non codon (intron).

The image displays two screenshots of the Ensembl genome browser interface. The top screenshot shows the full DNA sequence of the *NF- κ B1* gene, with exons highlighted in red and introns in black. The browser's navigation and search tools are visible at the top. The bottom screenshot shows a zoomed-in view of a specific region of the sequence, with a legend indicating 'Exons NFKB1 exons' and 'All exons in this region'. The sequence is color-coded according to the legend, with red text for exons and black text for introns. A cookie consent banner is present at the bottom of both screenshots.

Figure 2.2. Séquence du gène *NF- κ B1* à partir de plat forme Ensembl.org.

Chapitre 2. Matériels et Méthodes

Par la suite pour faciliter la recherche des amorces spécifiques de ce gène une séquence du gène *NF- κ B1* qui comporte plus précisément l'exon 6 a été copiée et collée dans un document Word (figure10).

```
TGTACACATGAGAACTACCTAGGTCTCATGAAGATCTTTTAAAACCCCTGATTTAAAATAT
TTTCAGATTTTGTGTTTTGGCTTTAGTTTCATTCCTATTATTACATTTTAGGTGCCCAA      exon
CTTCAAATTTTTCATATAATATAGGAAAAATAATGATTGAAACATTTAAATGTTCTTCTT
TACAGATGTTTCATTTGGATCCTTCTTTGACTCATACAATATTTAATCCAGAAGTATTTTC    6
AACCACAGATGGCACTGCCAACAGGTAAGAAAATCATCCCTGTTACCCTGTTGTTCTGC
TTTCAGTCTTAGTAAAATGCAGGATTTGTTAATAGTCTGTCTAGAAACTCAGTTGTGTA
CCTAGAAAGGAAATGGTGATTTGTTTTAAAAACCAATCTTTTAACATACTTCTTGAAT
ATATTTGCACAAAATATTTTCATCTCAATTACCCCTGTATGGTTTACTGCATTTTCATAT
```

Figure 2.3. : Séquence de l'exon 6 du gène *NF- κ B1*.

2.2.3. Le design des primer

A l'aide de NCBI (National centre for Biotechnologie Information) nous avons utilisé le programme Primer-Blast dans le site « www.ncbi.nih.gov » afin de concevoir les amorces recherchées.

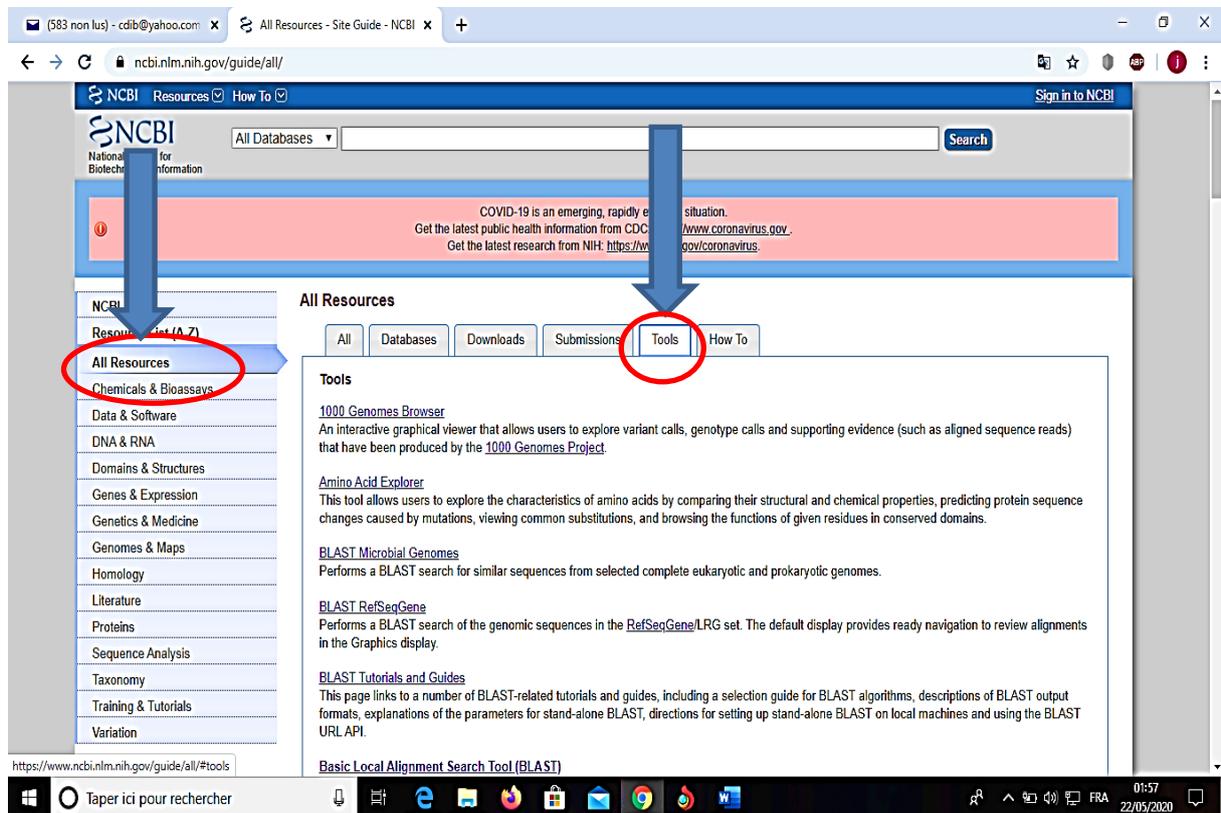


Figure 2.4. NCBI (National centre for Biotechnologie Information).

Chapitre 2. Matériels et Méthodes

2.2.3.1. Les étapes de Primer-Blast

Les figures suivant représentent les étapes à suivre dans l'utilisation de l'outil Primer-Blast pour obtenir des amorces spécifiques du gène *NF- κ B1*.

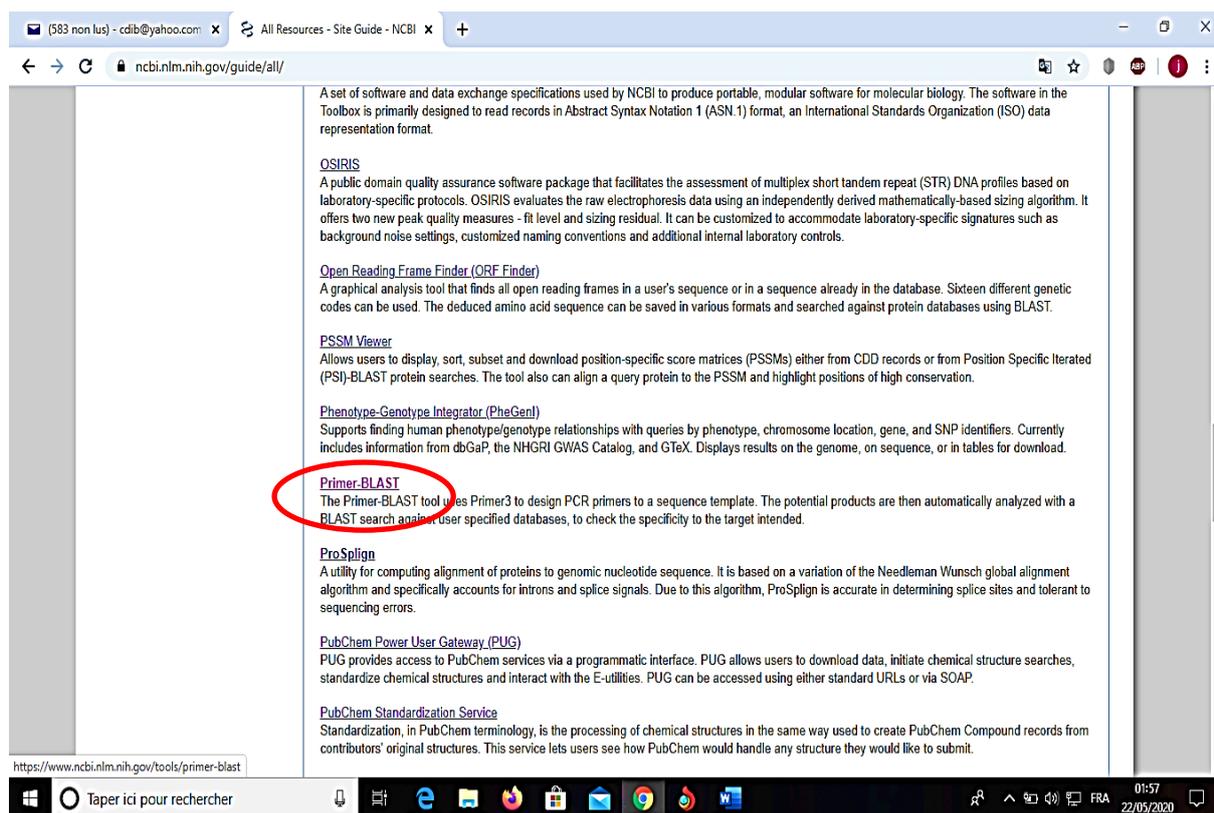


Figure 2.5. L'outil de Primer-Blast.

Chapitre 2. Matériels et Méthodes

Figure 2.6. Analyse de la séquence d'intérêt par le Primer-Blast.

2.2.4. Critères de la bonne amorce

Les caractéristiques d'une bonne amorce doit comporter les critères suivant :

- L'amorce spécifique doit être donnée le moins produit aspécifique afin d'amplifier le produit étudié.
- La température d'hybridation des deux amorces doit être les plus proches possibles car la température d'hybridation l'ors d'une PCR est programmé en une seule température.
- La teneur en CG doit être proche de 40%.

Chapitre3. Résultat et discussion

3.1. Résultat de Primer-Blast

Les résultats de conception d'amorce du gène *NF-κB1* de l'exon 6 c'est la première paire d'amorce qui se représente dans la figure suivant :

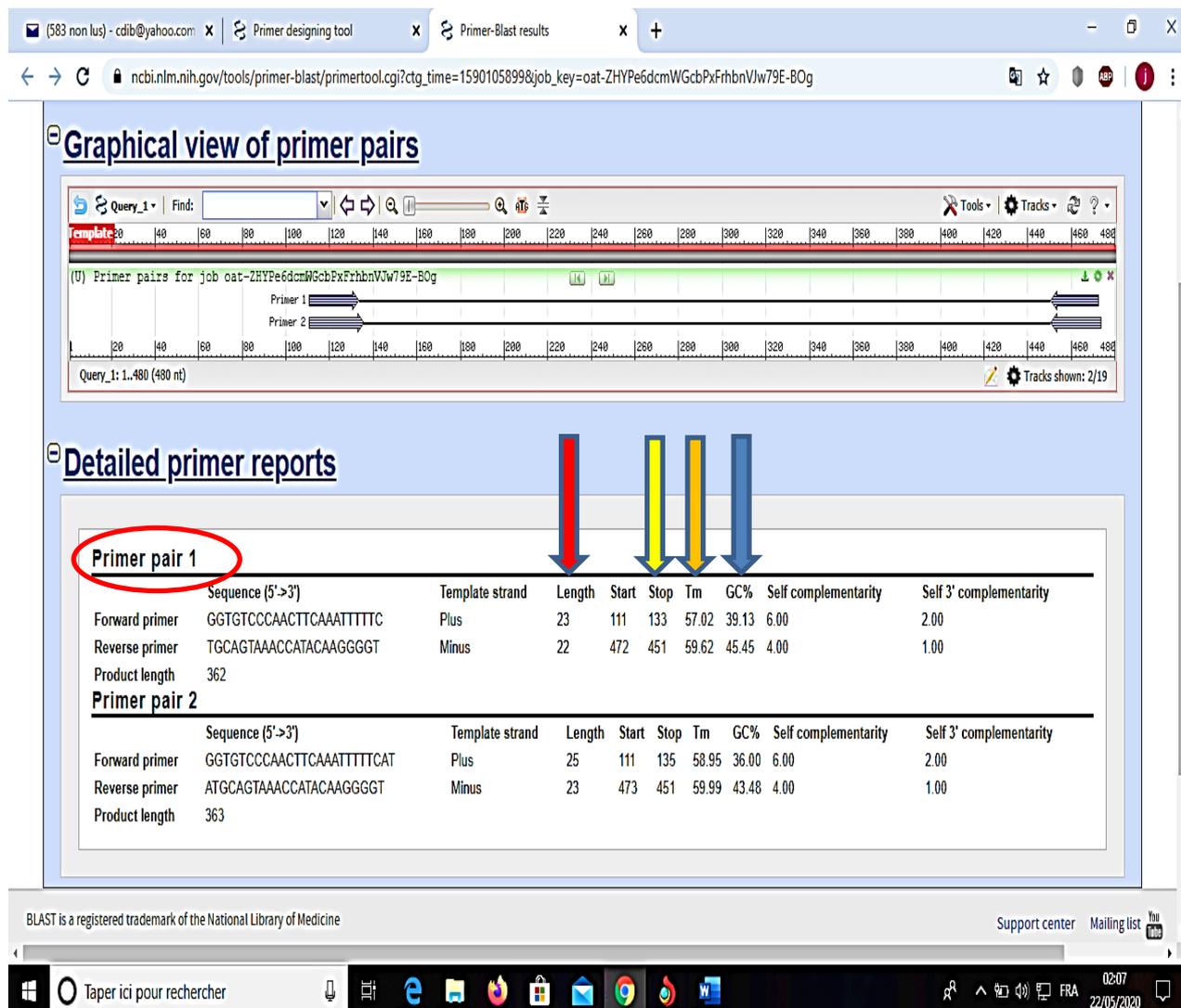


Figure 3.1. Résulta de Primer-Blast.

Chapitre3. Résultat et discussion

3.2. Confirmation du résultat

Les séquences des amorces subissent une analyse de confirmation qui se fait par le programme UCSC In Silico PCR *via* site : <http://genome.ucsc.edu/>.

Les résultats de cette analyse ont donné le produit qui se cartographie sur chromosome 4 (figure 15). Donc ces résultats nous ont confirmé la spécificité de cette amorce.

The screenshot shows the UCSC In-Silico PCR results page. The browser tabs include 'Primer-Blast results' and 'UCSC In-Silico PCR'. The URL is genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?hgid=838618299_ujWqPIKBSapqY2vrdJMHABMGkR&org=Human&db=hg38&wp_target=genome&wp_f=GGGTGC.... The page title is 'UCSC In-Silico PCR'. The main content area shows the following information:

UCSC In-Silico PCR

```
>chr4:10,629761+102530122 362bp GGTGTCCCACTCAAAATTTTC TGCAGTAAACCATACAAGGGGT  
GGTGTCCCACTCAAAATTTTCatataataggaaaaaatgattga  
aaacttaaatgttcttcttacagatgttcattggatcctcttga  
ctcacaatatttaaccagaagtattcaaccacagatggcactgcca  
acaggaagaacctcatcctgtaccctgttctctgttctcagcttt  
agtaaatgcaggattttaaagctctgtcctagaacctcagttgtga  
cctagaagaagtgtgattgttttaaaaccaatctttaacatact  
ttctggaatatattgcacaaaaatattcatctcaattACCCCTTGTA  
TGSTTACTGCA
```

Primer Melting Temperatures

Forward: 60.9 C ggtgtcccaacttcaaatTTTC
Reverse: 60.6 C tgcagtaaacatacaagggt
The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration. The code to calculate the melting temp comes from [Primer3](#).

Help

[What is chr_alt & chr_fix?](#)
[Replicating in-Silico PCR results on local machine](#)

Figure 3.2. Confirmation du résultat par le site UCSC In Silico PCR.

Chapitre3. Résultat et discussion

3.3. Discussion

La PCR s'est imposée comme une technologie particulièrement performante et accessible pour un grand nombre d'applications et de développement scientifique en raison de sa capacité de synthétiser et d'amplifier la séquence cible.

Ce formidable outil nécessite toutefois un mélange d'amorces qui peuvent être utilisées pour la même séquence d'ADN afin d'étudier les niveaux d'expressions des gènes dans différentes pathologies.

Plusieurs recherches scientifiques étudient et comparent les niveaux d'expressions du gène *NF- κ B1* dans différentes pathologies inflammatoires. Ces recherches sont basées sur l'utilisation de la technique RT-PCR qui sert à quantifier un échantillon d'ARN puis sera rétrotranscrit à un ADN complémentaire servant à la réalisation d'une PCR.

Dans ce concept on résume quelques études avec l'indication de la paire d'amorce utilisée :

- Dans une étude il a été montré que le polymorphisme du gène *NF- κ B1* peut être un facteur de risque dans le développement des maladies auto-immunes Graves et l'ophtalmopathie, cette hypothèse est confirmée par une RT-PCR qui est basée sur l'utilisation d'une amorce spécifique du gène *NF- κ B1* (Forward primer 5'TGGGCACAAGTCGTTATGA 3' et reverse primer 5'CTGGAGCCGGTAGGGAAG3')(Niyazoglu et al., 2014).
- Il a été établi que le polymorphisme du gène *NF- κ B1*(rs 4648068) est associé à la prolifération cellulaire et à la motilité dans le cancer gastrique, l'amorce qui a été utilisée dans cette étude (Forward primer 5' GAAGATCTATGACGCCTTGCACTTGGCAGTGA3' et reverse primer 5'GAAAGCTTTTAGCTGCTTTGAGAAGAGCT3')(Chen et al., 2015).
- A l'aide d'une PCR qui nécessite une amorce spécifique du gène *NF- κ B1* (Primer avant 5'TGGGCACAAGTCGTTTATG3' et un primer inverse 5'CTGGAGCCGGTAGGGAAG3') il a été montré que le polymorphisme -94 ins/del ATTGr (28362491) du gène *NF- κ B1* associé à la sensibilité et au développement de la maladie Beçhet (BD)(Yenmis et al., 2015)

Chapitre3. Résultat et discussion

- Une étude est constaté que le polymorphisme -94 ins/ del ATTG du gène *NF- κ B1* est l'une de polymorphisme qui permet la cancérogénèse et le développement du cancer épithélial de l'ovaire (COU) dans cette étude les chercheurs réalisent un RT-PCR qui est basé sur l'utilisation d'une amorce spécifique du gène *NF- κ B1* (Fawer primer 5'ACGTTGGATGCTCCGTGCTGCCTGCGTTC3'et reverse primer 5'ACGTTGGATGTAGGGAAGCCCCCAGGAAG3')(Huo et *al.*, 2013).

Chapitre 4. Conclusion et perspective

Conclusion et perspective

L'inflammation est un processus biologique complexe de système immunitaire contre diverses agressions, elle implique le déclenchement d'une cascade de réaction stimulant l'activation de multiples voies de signalisations en particulier : la voie de signalisation du NF- κ B qui joue un rôle central dans la régulation et le contrôle de ce processus.

Le système NF- κ B est un régulateur clé des réponses d'immunité innées et inflammatoires en raison de sa capacité d'induire l'expression des gènes de divers cytokines et chimiokines qui vont médier et réguler les réponses inflammatoires, par conséquent le dérèglement de l'un de ces membres ou de leur activité peut contribuer aux développements de plusieurs maladies inflammatoires.

Au cours des dernières années, l'étude de l'expression du gène *NF- κ B1* dans le processus inflammatoire est devenue un objet d'étude intense afin de développement des thérapies qui modulent l'activité inflammatoire du NF- κ B dans les différentes pathologies inflammatoires.

Dans cette étude, nous avons conçus des amorces à l'aide de l'outil Primer-Blast dans le but de réaliser ultérieurement une PCR et amplifier le gène *NF- κ B1*, cette étape est très importante pour déterminer les différents niveaux d'expression de ce gène dans le processus inflammatoire, ainsi que pour développer des stratégies thérapeutiques spécifiques et efficaces pour divers pathologies inflammatoires.

Chapitre 5. Références bibliographiques

Références bibliographiques

Ahrberg, C.D., Ilic, B.R., Manz, A., and Neuzil, P. (2016). Handheld real-time PCR device. *Lab on a Chip* 16, 586–592.

Bhatt, D., and Ghosh, S. (2014). Regulation of the NF- κ B-Mediated Transcription of Inflammatory Genes. *Front Immunol* 5, 71.

Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., and Zhao, L. (2018a). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* 9, 7204–7218.

Chen, Y., Lu, R., Zheng, H., Xiao, R., Feng, J., Wang, H., Gao, X., and Guo, L. (2015). The NFKB1 polymorphism (rs4648068) is associated with the cell proliferation and motility in gastric cancer. *BMC Gastroenterol* 15, 21.

Dimitrakopoulos, F.-I.D., Antonacopoulou, A.G., Kottorou, A.E., Maroussi, S., Panagopoulos, N., Koukourikou, I., Scopa, C., Kalofonou, M., Koutras, A., Makatsoris, T., et al. (2018). NF- κ B2 Genetic Variations are Significantly Associated with Non-Small Cell Lung Cancer Risk and Overall Survival. *Sci Rep* 8, 5259.

Eming, S.A., Krieg, T., and Davidson, J.M. (2007). Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology* 127, 514–525.

Feehan, K.T., and Gilroy, D.W. (2019). Is Resolution the End of Inflammation? *Trends in Molecular Medicine* 25, 198–214.

Franceschi, C., and Campisi, J. (2014). Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 69, S4–S9.

Freire, M.O., and Van Dyke, T.E. (2013a). Natural resolution of inflammation. *Periodontol.* 2000 63, 149–164.

Fu, W., Zhuo, Z.-J., Chen, Y.-C., Zhu, J., Zhao, Z., Jia, W., Hu, J.-H., Fu, K., Zhu, S.-B., He, J., et al. (2017a). NFKB1 -94insertion/deletion ATTG polymorphism and cancer risk: Evidence from 50 case-control studies. *Oncotarget* 8, 9806–9822.

Gasparini, C., and Feldmann, M. (2012a). NF- κ B as a target for modulating inflammatory responses. *Curr. Pharm. Des.* 18, 5735–5745.

Hawiger, J., and Zienkiewicz, J. (2019). Decoding inflammation, its causes, genomic responses, and emerging countermeasures. *Scandinavian Journal of Immunology* 90.

Higgins, M., Ravenhall, M., Ward, D., Phelan, J., Ibrahim, A., Forrest, M.S., Clark, T.G., and Campino, S. (2019). PrimedRPA: primer design for recombinase polymerase amplification assays. *Bioinformatics* 35, 682–684.

Chapitre 5. Références bibliographiques

Hoesel, B., and Schmid, J.A. (2013). The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Mol. Cancer* 12, 86.

Huo, Z.H., Zhong, H.J., Zhu, Y.S., Xing, B., and Tang, H. (2013). Roles of functional NFKB1 and β TrCP insertion/deletion polymorphisms in mRNA expression and epithelial ovarian cancer susceptibility. *Genetics and Molecular Research* 12.

J., S. (2013). Inflammation and Acute Phase Proteins in Haemostasis. In *Acute Phase Proteins*, S. Janciauskiene, ed. (InTech), p.

de Jesús, T.J., and Ramakrishnan, P. (2020a). NF- κ B c-Rel Dictates the Inflammatory Threshold by Acting as a Transcriptional Repressor. *IScience* 23, 100876.

Jimi, E., Takakura, N., Hiura, F., Nakamura, I., and Hirata-Tsuchiya, S. (2019a). The Role of NF- κ B in Physiological Bone Development and Inflammatory Bone Diseases: Is NF- κ B Inhibition “Killing Two Birds with One Stone”? *Cells* 8.

Kuba, A., Raida, L., Mrazek, F., Schneiderova, P., Kriegova, E., Langova, K., Furst, T., Furstova, J., Faber, E., and Papajik, T. (2020). NFKB1 gene single-nucleotide polymorphisms: implications for graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annals of Hematology* 99, 609–618.

Lawrence, T., and Fong, C. (2010). The resolution of inflammation: Anti-inflammatory roles for NF- κ B. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42, 519–523

Li, L., and Zhang, Z.-T. (2019). Genetic Association between NFKBIA and NFKB1 Gene Polymorphisms and the Susceptibility to Head and Neck Cancer: A Meta-Analysis. *Dis. Markers* 2019, 6523837

Li, H., Liu, J., Yao, J., Zhong, J., Guo, L., and Sun, T. (2016). Fracture initiates systemic inflammatory response syndrome through recruiting polymorphonuclear leucocytes. *Immunol. Res.* 64, 1053–1059.

Liu, T., Zhang, L., Joo, D., and Sun, S.-C. (2017a). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2.

Lorenz, T.C. (2012b). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*.

Mackay, I.M. (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research* 30, 1292–1305.

Medzhitov, R. (2010). Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell* 140, 77Lorenz, T.C. (2012a). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Vi*1–776.

Meng, Q., Wu, W., Pei, T., Xue, J., Xiao, P., Sun, L., Li, L., and Liang, D. (2020). miRNA-129/FBW7/NF- κ B, a Novel Regulatory Pathway in Inflammatory Bowel Disease. *Mol Ther Nucleic Acids* 19, 731–740.

Muxel, S.M., Laranjeira-Silva, M.F., Carvalho-Sousa, C.E., Floeter-Winter, L.M., and Markus, R.P. (2016). The RelA/cRel nuclear factor- κ B (NF- κ B) dimer, crucial for inflammation resolution, mediates the

Chapitre 5. Références bibliographiques

transcription of the key enzyme in melatonin synthesis in RAW 264.7 macrophages. *Journal of Pineal Research* 60, 394–404.

Mussbacher, M., Salzman, M., Brostjan, C., Hoesel, B., Schoergenhofer, C., Datler, H., Hohensinner, P., Basílio, J., Petzelbauer, P., Assinger, A., et al. (2019a). Cell Type-Specific Roles of NF- κ B Linking Inflammation and Thrombosis. *Front Immunol* 10, 85.

Netea, M.G., Balkwill, F., Chonchol, M., Cominelli, F., Donath, M.Y., Giamarellos-Bourboulis, E.J., Golenbock, D., Gresnigt, M.S., Heneka, M.T., Hoffman, H.M., et al. (2017). A guiding map for inflammation. *Nature Immunology* 18, 826–831.

Nogva, H.K., and Rudi, K. (2004). Potential influence of the first PCR cycles in real-time comparative gene quantifications. *BioTechniques* 37, 246–253.

Niyazoglu, M., Baykara, O., Koc, A., Aydoğdu, P., Onaran, I., Dellal, F.D., Tasan, E., and Sultuybek, G.K. (2014). Association of PARP-1, NF- κ B, NF- κ BIA and IL-6, IL-1 β and TNF- α with Graves Disease and Graves Ophthalmopathy. *Gene* 547, 226–232.

Rinttilä, T., Ülle, K., Apajalahti, J., Timmons, R., and Moran, C.A. (2020a). Design and validation of a real-time PCR technique for assessing the level of inclusion of fungus- and yeast-based additives in feeds. *Journal of Microbiological Methods* 171, 105867.

Rostan, O., Tarte, K., and Amé-Thomas, P. (2014). Le polynucléaire basophile: nouveautés en physiopathologie et implications diagnostiques. *Revue Francophone des Laboratoires* 2014, 95–105.

Shi, J., and Sun, S.-C. (2015). TCR signaling to NF- κ B and mTORC1: Expanding roles of the CARMA1 complex. *Mol. Immunol.* 68, 546–557.

Starks, B.W., Corstvet, R.E., and Buckner, R.G. (1976). Certain characteristics of the infective agent of feline infectious peritonitis. *Am. J. Vet. Res.* 37, 335–338. Sochocka, M., Diniz, B.S., and Leszek, J. (2017). Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe? *Mol. Neurobiol.* 54, 8071–8089. Starks, B.W., Corstvet, R.E., and Buckner, R.G. (1976). Certain characteristics of the infective agent of feline infectious peritonitis. *Am. J. Vet. Res.* 37, 335–338.

Sugimoto, M.A., Sousa, L.P., Pinho, V., Perretti, M., and Teixeira, M.M. (2016). Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset? *Frontiers in Immunology* 7.

Sun, S.-C. (2012). The noncanonical NF- κ B pathway. *Immunol. Rev.* 246, 125–140.

Sun, S.-C. (2017a). The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 545–558.

Sun, X.-F., and Zhang, H. (2007). NFKB and NFKBI polymorphisms in relation to susceptibility of tumour and other diseases. *Histol. Histopathol.* 22, 1387–1398.

Sun, S.-C., Chang, J.-H., and Jin, J. (2013). Regulation of nuclear factor- κ B in autoimmunity. *Trends Immunol.* 34, 282–289.

Chapitre 5. Références bibliographiques

Valones, M.A.A., Guimarães, R.L., Brandão, L.A.C., Souza, P.R.E. de, Carvalho, A. de A.T., and Crovela, S. (2009). Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Brazilian Journal of Microbiology* 40, 1–11.

Villeneuve, D.L., Landesmann, B., Allavena, P., Ashley, N., Bal-Price, A., Corsini, E., Halappanavar, S., Hussell, T., Laskin, D., Lawrence, T., et al. (2018). Representing the Process of Inflammation as Key Events in Adverse Outcome Pathways. *Toxicological Sciences* 163, 346–352.

Wang, N., Liang, H., and Zen, K. (2014). Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Front Immunol* 5, 614. Wang, W., Mani, A.M., and Wu, Z.-H. (2017). DNA damage-induced nuclear factor-kappa B activation and its roles in cancer progression. *J Cancer Metastasis Treat* 3, 45–59.

Yahfoufi, N., Alsadi, N., Jambi, M., and Matar, C. (2018). The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. *Nutrients* 10.

Yenmis, G., Oner, T., Cam, C., Koc, A., Kucuk, O.S., Yakicier, M.C., Dizman, D., and Kanigur Sultuybek, G. (2015). Association of *NFKB1* and *NFKBIA* Polymorphisms in Relation to Susceptibility of Behçet's Disease. *Scandinavian Journal of Immunology* 81, 81–86.

Zhang, H., and Sun, S.-C. (2015a). NF-κB in inflammation and renal diseases. *Cell Biosci* 5, 63. Zhao, M., Joy, J., Zhou, W., De, S., Wood, W.H., Becker, K.G., Ji, H., and Sen, R. (2018).

Transcriptional outcomes and kinetic patterning of gene expression in response to NF-κB activation. *PLOS Biology* 16, e2006347.

Introduction : Le processus inflammatoire est défini comme une réponse cellulaire multiphasique et multifactorielle à une variété de stimulants pathologiques.

Plusieurs cellules et molécules inflammatoires sont impliquées dans le processus inflammatoire, parmi ces derniers le facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) qui joue un rôle majeur dans l'orchestration de la réponse inflammatoire, en raison de sa capacité d'induire l'expression d'un grand nombre de gènes qui participent dans la régulation de l'inflammation

Objectif : Réalisation d'une séquence d'oligonucléotides qui servira d'une amorce pour une PCR.

Matériel et Méthodes : Concevoir une amorce de l'exon 6 du gène *NF- κ B1* à l'aide de programme Primer- Blast via le site « www.ncbi.nih.gov ».

Résultat : Le choix est porté sur la première paire d'amorce du gène *NF- κ B1* en raison des critères requis et des produits aspécifiques supérieur à 1000 paires de bases.

Conclusion : Dans cette étude, nous avons conçus des amorces à l'aide d'utilisation du programme Primer-Blast dans le but de réaliser ultérieurement une PCR et amplifier le gène *NF- κ B1*, cette étape est très importante pour déterminer l'expression de ce gène dans le processus inflammatoire, ainsi que pour développer des stratégies thérapeutiques spécifique et efficace pour divers pathologies inflammatoires.

Mot clé : Processus inflammatoire, Gène *NF- κ B1*, Conception d'amorce, Primer- Blast.

Introduction: The inflammatory process is defined as a multiphasic and multifactorial cellular response to a variety of pathological stimulants.

Several inflammatory cells and molecules are involved in the inflammatory process, among them the nuclear factor kappa B (NF- κ B) which plays a major role in the orchestration of the inflammatory response, due to its ability to induce expression a large number of genes involved in the regulation of inflammation.

Objective: Realization of an oligonucleotide sequence that will serve as a primer for a PCR.

Materials and Methods: Design a primer for exon 6 of the NF- κ B1 gene using the Primer-Blast program via the site "www.ncbi.nih.gov".

Result: The choice is made on the first primer pair of the NF- κ B1 gene because of the required criteria and non-specific products greater than 1000 base pairs.

Conclusion: In this study, we designed primers using the use of the Primer-Blast program in order to subsequently perform PCR and amplify the NF- κ B1 gene, this step is very important to determine the expression of this gene in the inflammatory process, as well as to develop specific and effective therapeutic strategies for various inflammatory pathologies.

Keyword: Inflammatory process, NF- κ B1 gene, Primer design, Primer-Blast.

المقدمة : يتم تعريف العملية الالتهابية على أنها استجابة خلوية متعددة الأطوار ومتعددة العوامل لمجموعة متنوعة من المحفزات المرضية من أجل حماية أنسجة المستهدف. تشارك العديد من الخلايا والجزيئات الالتهابية؛ من بين هؤلاء ، العامل النووي NF- κ B ، الذي يلعب دوراً رئيسياً في تنظيم الاستجابة الالتهابية؛ بسبب قدرته على إحداث التعبير عن عدد كبير من الجينات المشاركة في الالتهاب.

موضوعي : يتكون من تصميم أساس محدد للجين *NF- κ B1* مرتبط بعملية الالتهاب

المواد وطريقة: تصميم تمهيدي يحيط -. exon 6 من جين NF- κ B1 باستخدام برنامج التفجير التمهيدي عبر موقع www.ncbi.nih.gov.

نتيجة: يعطي التصميم التمهيدي للجين *NF- κ B1* من exon 6 الزوج الأول كبدية محددة للجين *NF- κ B1*.

خاتمة: خاتمة: لخلاصة: في هذه الدراسة ، قمنا بتصميم مواد أولية باستخدام برنامج Primer-Blast من أجل إجراء PCR لاحقاً وتضخيم جين NF- κ B1 ، وهذه الخطوة مهمة جداً لتحديد التعبير عن هذا الجين في العملية الالتهابية ، وكذلك لتطوير استراتيجيات علاجية محددة وفعالة لمختلف الأمراض الالتهابية.

الكلمة الرئيسية: العملية الالتهابية ، الجين *NF- κ B1* ، التصميم التمهيدي ، Primer- Blast