



TLEMCEEN N°D'ORDRE



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

UNIVERSITE DE TLEMCEEN- ABOU BEKR BELKAID
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 – BIOMOLIM W0414100

MÉMOIRE

Présenté par

ZERROUK Hicham

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Immunologie

Intitulé :

GATA-3 design des cellules Th2 CD4+

————— *Sous la direction du Professeur Mourad ARIBI* —————

Soutenu le 20/09/2020

Jury :

**Pr. SMAHI
Mohammed Chems
Eddine**

Professeur

Université de
Tlemcen, Algérie

Président

Pr. ARIBI Mourad

Professeur

Université de
Tlemcen, Algérie

Encadreur

Dr. BRAHAMI Nabila

Maitre de conférences
A

Université de
Tlemcen, Algérie

Examinatrice

20 Septembre 2020



TLEMCEEN N°D'ORDRE



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

UNIVERSITE DE TLEMCEEN-ABOU BEKR BELKAID
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 – BIOMOLIM W0414100

MÉMOIRE

Présenté par

ZERROUK Hicham

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Immunologie

Intitulé :

GATA-3 design des cellules Th2 CD4+

————— *Sous la direction du Professeur Mourad ARIBI* —————

Soutenu le 20/09/2020

Jury :

Pr. SMAHI Mohammed Chems Eddine	Professeur	Université de Tlemcen, Algérie	Président
Pr. ARIBI Mourad	Professeur	Université de Tlemcen, Algérie	Encadreur
Dr. BRAHAMI Nabila	Maitre de conférences A	Université de Tlemcen, Algérie	Examinatrice

20 Septembre 2020

Résumé

Introduction : Les cellules Th2 sont cruciales dans les réponses immunitaires adaptatives aux infections dues aux parasites extracellulaires tels que les helminthes. Les Th2 sont également responsables du développement de certaines maladies inflammatoires asthmatiques et allergiques. Le GATA-3 est le facteur de transcription clé régulant la différenciation et le maintien de la production de cytokines Th2.

Objectif : L'élaboration des séquences d'oligonucléotides qui serviront d'amorces à l'amplification du gène *GATA3* par PCR.

Matériel et méthodes : Nous avons réalisé une étude bio-informatique pour obtenir une amorce spécifique au gène *GATA3*. Pour cela on a cherché la séquence spécifique au gène *GATA3* à l'aide de la base de données www.ensembl.org, puis on a utilisé l'outil Primer-BLAST fournie par NCBI pour concevoir l'amorce. Enfin, on a confirmé les résultats par une PCR *in silico*.

Résultats : L'utilisation de l'outil Primer-BLAST a permis d'obtenir une amorce spécifique au gène *GATA3* à savoir : F primer CCCCAATGCTCCCAAAGTC, R primer GGGCGATGTACGTTCTTCCT avec un produit spécifique de 367 pb, Tm (F primer : 59,39 °C, R primer : 59,82 °C), la teneur en GC est de 55 % pour l'amorce sens et anti sens et une longueur de 20 nucléotides pour les deux amorces.

Conclusions : L'utilisation des outils de la bioinformatique, tel que l'outil de conception d'amorces (Primer-Blast), nous a permis d'établir des amorces PCR pouvant être utilisés aux protocoles expérimentaux dans les laboratoires de recherche et de diagnostic.

Mots clé : gène *GATA-3*, Th2, conception d'amorces, Primer-BLAST .

Abstract

Introduction: Th2 cells are crucial in adaptive immune responses to infections due to extracellular parasites such as helminths. Th2 is also responsible for the development of certain inflammatory asthmatic and allergic diseases. GATA-3 is the key transcription factor regulating the differentiation and maintenance of Th2 cytokine production.

Objective: The development of the oligonucleotide sequences that will serve as primers for the amplification of the GATA3 gene by PCR.

Material and methods: We carried out a bioinformatics study to obtain a primer specific to the GATA3 gene. For this we searched for the specific sequence of the GATA3 gene using the database www.ensembl.org, then we used the Primer-BLAST tool provided by NCBI to design the primer. Finally, the results were confirmed by in silico PCR.

Results: The use of the Primer-BLAST tool made it possible to obtain a primer specific to the GATA3 gene, namely: F primer CCCCAATGCTCCCAAAGTC, R primer GGGCGATGTACGTTCTTCCT with a specific product of 367 bp, T_m (F primer: 59.39 ° C, R primer: 59.82 ° C), the GC content is 55% for the forward and reverse primer and a length of 20 nucleotides for the two primers.

Conclusions: The use of bioinformatics tools, such as the primer design tool (Primer-Blast), allowed us to establish PCR primers that can be used in experimental protocols in research and diagnostic laboratories.

Keywords: GATA-3 gene, Th2, primer design, Primer-BLAST.

ملخص

مقدمة : تعتبر خلايا Th2 حاسمة في الاستجابات المناعية التكيفية للعدوى بسبب الطفيليات خارج الخلية مثل الديدان الطفيلية. Th2 مسؤول أيضًا عن تطور بعض أمراض الحساسية والربو الالتهابية. GATA-3 هو عامل النسخ الرئيسي الذي ينظم تمايز وصيانة إنتاج السيتوكين Th2.

المقدمة : تطوير تسلسل قليل النوكليوتيد الذي سيكون بمثابة بادئات لتضخيم جين GATA3 بواسطة PCR. **المواد والطرق:** قمنا بدراسة المعلوماتية الحيوية للحصول على أساس خاص بجين GATA3. للقيام بذلك ، بحثنا عن التسلسل الخاص بجين GATA3 باستخدام قاعدة البيانات www.ensemble.org ، ثم استخدمنا أداة Primer-BLAST التي يوفرها NCBI لتصميم التمهيدي. أخيرًا ، تم تأكيد النتائج بواسطة PCR *in silico*.

النتائج: أتاح استخدام أداة Primer-BLAST من الممكن الحصول محددة التمهيدي لهذا الجين GATA3. وهو: F primer CCCAATGCTCCCAAAGTC, R primer GGGCGATGTACGTTCTTCCT
محتوى GC هو 55% للطلاء التمهيدي الأمامي والخلفي وطول Tm (F primer: 59.39 ° C, R primer: 59.82 ° C)
20 نيوكليوتيدات لكلا البادئين.

الاستنتاجات: استخدام أدوات المعلوماتية الحيوية ، مثل أداة التصميم التمهيدي (Primer-Blast) ، سمح لنا بإنشاء بادئات PCR يمكن استخدامها في البروتوكولات التجريبية في مختبرات البحث والتشخيص.

الكلمات المفتاحية : جين GATA-3 , Th2 , تصميم البادئات برايمر بلاست

Avant-propos

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

A l'issue de ce travail, je tiens à adresser mes plus sincères remerciements au Pr. Mourad ARIBI, mon encadreur. Merci vivement pour votre aide, votre disponibilité, votre dynamisme et votre rigueur scientifique et vos précieux conseils.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance et ma gratitude au Docteur NOUARI Wafa pour ses qualités scientifiques et surtout humaines qui étaient toujours une source de motivation.

Je voudrais également remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'ausculter ma Thèse à savoir le Pr. SMAHI Mohammed ChemsEddine (Université de Tlemcen), Dr. BRAHAMI Nabila (Université de Tlemcen).

Un grand merci à tous les membres du Laboratoire de BIOMOLIM enseignants, doctorant, ingénieurs de laboratoire pour leurs compétences.

Je tiens également à remercier mes parents, vous m'avez toujours aidé, soutenu. C'est grâce à vous si aujourd'hui j'en suis arrivé là, merci pour tout.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	III
Abstract	IV
Résumé en Arabe	V
Avant-propos	VI
Table des matières	VII
Liste des figures	IX
Liste des tableaux	X
Liste des abréviations	XI
Introduction	1
Chapitre 1. Revue de la littérature	2
1. Populations lymphocytaires T helper	2
1.1. Généralités	2
1.2. Développement des lymphocytes T $\alpha\beta$	3
1.3. Différentiation et polarisation des lymphocytes T helper	5
1.4. Les lymphocytes Th1	6
1.5. Les lymphocytes Th2	7
1.6. Régulation croisée de la différenciation des auxiliaires en T	9
1.7. Déséquilibre de la balance Th1/Th2	10
2. Gène GATA3	10
2.1. Définition	10
2.2. Protéine GATA3 dans le complexe du facteur de transcription	11
2.3. GATA3 dans la différenciation et la fonction des cellules Th2	14
2.3.1. Voie dépendante de STAT6	14
2.3.2. Voie indépendante de STAT6	15
2.4. Régulation transcriptionnelle par GATA3	16
2.5. GATA3 et cancer du sein	17
3. PCR	18
3.1. Définition	18
3.2. Principe de la PCR	18
3.3. Etapes	19
3.4. Acteur de PCR	21

3.5. Choix d'amorces.....	21
4. Problématique et objectif.....	22
4.1. Problématique	22
4.2. Objectif.....	23
4.3. But	23
Chapitre 2. Matériel et méthodes.....	24
2.1 Conception des amorces pour la PCR.....	24
2.2 Sélection des amorces.....	24
2.3 Recherche de la séquence de référence du gène GATA3	26
2.4 Le design des Primer	28
2.5 Analyse des Résultats du Primer-BLAST	28
Chapitre 3. Résultats.....	29
3.1 Résultats de la conception des amorces.....	29
3.2 Confirmations des résultats:	32
3.3 Discussion.....	33
Chapitre 4. Conclusions et perspectives.....	34
Chapitre 5. Bibliographie.....	35

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Représentation schématique d'une coupe de thymus	3
Figure 1.2. Schéma du développement des lymphocytes T $\alpha\beta$ dans le thymus	5
Figure 1.3. Différenciation lymphocytes T helper et facteurs de transcription	6
Figure 1.4. Fonctions des cellules TH2	7
Figure 1.5. Voies de signalisation dans la différenciation Th2	8
Figure 1.6. Régulation croisée entre les facteurs impliqués dans la différenciation Th1 et Th2	9
Figure 1.7. Localisation du gène GATA3 sur le chromosome 10 humain	10
Figure 1.8. Domaines fonctionnels et acides aminés essentiels dans la souris GATA3	12
Figure 1.9. GATA3 est requis à la fois pour les voies dépendantes de STAT6 et indépendantes	15
Figure 1.10. Etapes d'amplification par PCR d'une ADN cible	20
Figure 2.1. Plateforme de la base de données Ensembl	26
Figure 2.2. Séquence du gène GATA3 par le site Ensembl	27
Figure 2.3. La séquence de l'exon 1 du gène GATA3	27
Figure 2.4. Outil Primer-BLAST	28
Figure 3.1. Résultats du Primer-BLAST	29
Figure 3.2. Amorces spécifiques	30
Figure 3.3. Confirmation des Résultats par le site UCSC in silico PCR	32

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1. La fonction de GATA3 dans divers tissus.

13

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : acide desoxyribonucleique

ARN : acide ribonucleique

CSH: cellule souche hématopoïétique

DC: dendritic cell (cellule dendritique)

DN : double negative

DP : double positive

ETP: progéniteur hématopoïétique précoce

Foxp3: forkhead box p3

GATA 3: *gata-binding protein 3*

GM-CSF: granulo-monocytes-colony stimulating factor

IFN : interferon

Ig: immunoglobuline

IL : interleukine

LT : lymphocyte T

PCR : polymerase chain reaction

PLC : progéniteur lymphoïde commun

PMC : progéniteur myéloïde commun

RAG: recombination activating gene

T-bet: *T-box-expressed-in-T-cells*

TCR : récepteur de la cellule t (*T cell receptor*)

TGF- β : facteur de croissance transformant β (*Transforming Growth Factor- β*)

Th: lymphocyte T helper

Th1: lymphocyte T helper de type 1

Th2: lymphocyte T helper de type 2

TNF: facteur de nécrose tumorale (*Tumor Necrosis Factor*)

Treg : cellule T régulatrice

Zn : zinc

Introduction

Les cellules T CD4⁺ naïves, lors de l'activation, se différencient en sous-ensembles T auxiliaires (Th) distincts qui produisent des cytokines spécifiques à la lignée. En produisant des ensembles uniques de cytokines, les sous-ensembles effecteurs Th jouent un rôle essentiel dans l'orchestration des réponses immunitaires à une variété d'infections et sont impliqués dans la pathogenèse de nombreuses maladies inflammatoires, notamment l'auto-immunité, l'allergie et l'asthme. La différenciation des cellules Th repose sur la force de la signalisation des récepteurs des cellules T (TCR) et des signaux déclenchés par les cytokines polarisantes qui activent et / ou régulent à la hausse des facteurs de transcription particuliers. Plusieurs facteurs de transcription maîtresse spécifiques à la lignée dictent le sort et les fonctions des cellules Th. Bien que ces régulateurs principaux se régulent mutuellement, leur expression peut être dynamique. Parfois, ils sont même coexprimés, ce qui entraîne une hétérogénéité et une plasticité massives des cellules Th (Onodera et al., 2018).

En outre, La différenciation de Th2 dépendante ou indépendante de l'IL-4 nécessite le facteur de transcription clé GATA-3 (Scheinman and Avni, 2009), qui est responsable des changements épigénétiques dans de nombreux locus géniques spécifiques de Th2 et de l'activation directe de la transcription. De plus le GATA3 peut favoriser la différenciation des cellules Th2 *via* différents mécanismes.

Le gène *GATA3* (GATA binding protein 3) est un gène qui code pour une protéine qui appartient à la famille GATA des facteurs de transcription (Rao et al., 2020). Cette protéine Possède deux doigts de zinc de type GATA. Le gène *GATA3* est un régulateur fondamental dans le développement des cellules T.

Par conséquent, *GATA3* a été identifié comme un maître régulateur qui contrôle la différenciation des cellules Th2 et la production de cytokines Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) en se liant à une large gamme de locus du gène des cytokines Th2 tandis que *GATA3* supprime la différenciation des cellules Th1 en bloquant la transcription des gènes spécifiques Th1. Parmi les gènes des cytokines Th2, IL-5 et IL-13 sont directement régulés par la liaison de *GATA3* avec la région promotrice correspondante (Nomura et al., 2019).

Notre travail consiste à élaborer des amorces qui serviront à amplifier la séquence d'oligonucléotides contenant le gène *GATA3* qui contribue à la différenciation des cellules Th2.

Chapitre 1. Revue de la littérature

1. Populations lymphocytaires T helper

1.1. Généralités

Les lymphocytes T CD4⁺ sont essentiels pour obtenir une réponse immunitaire efficace régulée contre les agents pathogènes. Les lymphocytes T Naïve CD4⁺ sont activés après interaction avec le complexe antigène-CMH et se différencient en sous-types spécifiques en fonction principalement du milieu des cytokines du microenvironnement (Nakayamada et al., 2012). Outre le T-helper 1 et le T-helper 2 classiques, d'autres sous-ensembles ont été identifiés, dont le T-helper 17, le lymphocyte T régulateur, le lymphocyte T folliculaire et le T-helper 9, chacun avec un profil de cytokine caractéristique. Pour qu'un phénotype particulier soit différencié, un ensemble de voies de signalisation des cytokines couplé à l'activation de facteurs de transcription spécifiques à la lignée et à des modifications épigénétiques au niveau des gènes appropriés est requis. Les fonctions effectrices de ces cellules sont médiées par les cytokines sécrétées par les cellules différenciées (Luckheeram et al., 2012).

La rencontre entre un lymphocyte T et une CPA et donc, l'interaction privilégiée entre le TCR et le complexe CMH/peptide spécifique va permettre l'activation et l'expansion clonale du lymphocyte T. La cellule T *via* son TCR (hétérodimère glycosylé polymorphe) accumule des informations quantitatives et qualitatives sur cet antigène, l'objectif étant ensuite de relayer ces informations à l'intérieur de la cellule. Cependant, l'absence de domaines intracellulaires pour le TCR va nécessiter l'association et le transfert d'informations de ce récepteur aux molécules CD3, protéines non polymorphes dotées d'importants domaines intracellulaires de signalisation. Le complexe TCR/CD3 ainsi formé va pouvoir induire les voies de transduction du signal proximales et précoces permettant ainsi l'activation de la cellule T (Glassman et al., 2018).

Après une infection, les lymphocytes T se différencient en une population hétérogène de lymphocytes T effecteurs qui peuvent médier la clairance des pathogènes. Un sous-ensemble de ces cellules T effectrices possède la capacité de survivre à long terme et de mûrir en cellules T mémoire capables de fournir une immunité à long terme. La

compréhension des signaux qui régulent le développement des cellules T mémoire est crucial pour les efforts de conception de vaccins capables de provoquer une immunité à base de cellules T. Les lymphocytes T CD4⁺ sont essentiels à la formation de lymphocytes T CD8⁺ à mémoire protectrice après une infection ou une immunisation (Laidlaw et al., 2016).

1.2. Développement des lymphocytes T $\alpha\beta$

Les précurseurs des lymphocytes T, nommés *Early Thymic Progenitor* (ETP), dérivant d'une cellule souche hématopoïétique lymphoïde commune, quittent la moelle osseuse afin de rejoindre le thymus (Figure 1.1), un organe lymphoïde primaire où ces cellules trouveront le microenvironnement adéquat pour acquérir leurs maturations et devenir des lymphocytes T fonctionnelles (Rushdi et al., 2020).

Une fois dans le thymus, les cellules ETP sont appelées thymocytes double négatifs CD4-CD8- (DN), correspondent aux thymocytes les plus immatures, et vont migrer depuis la jonction cortico-médullaire vers la région sous-capsulaire du cortex thymique (von Boehmer, 2014) (Figure 1.1).

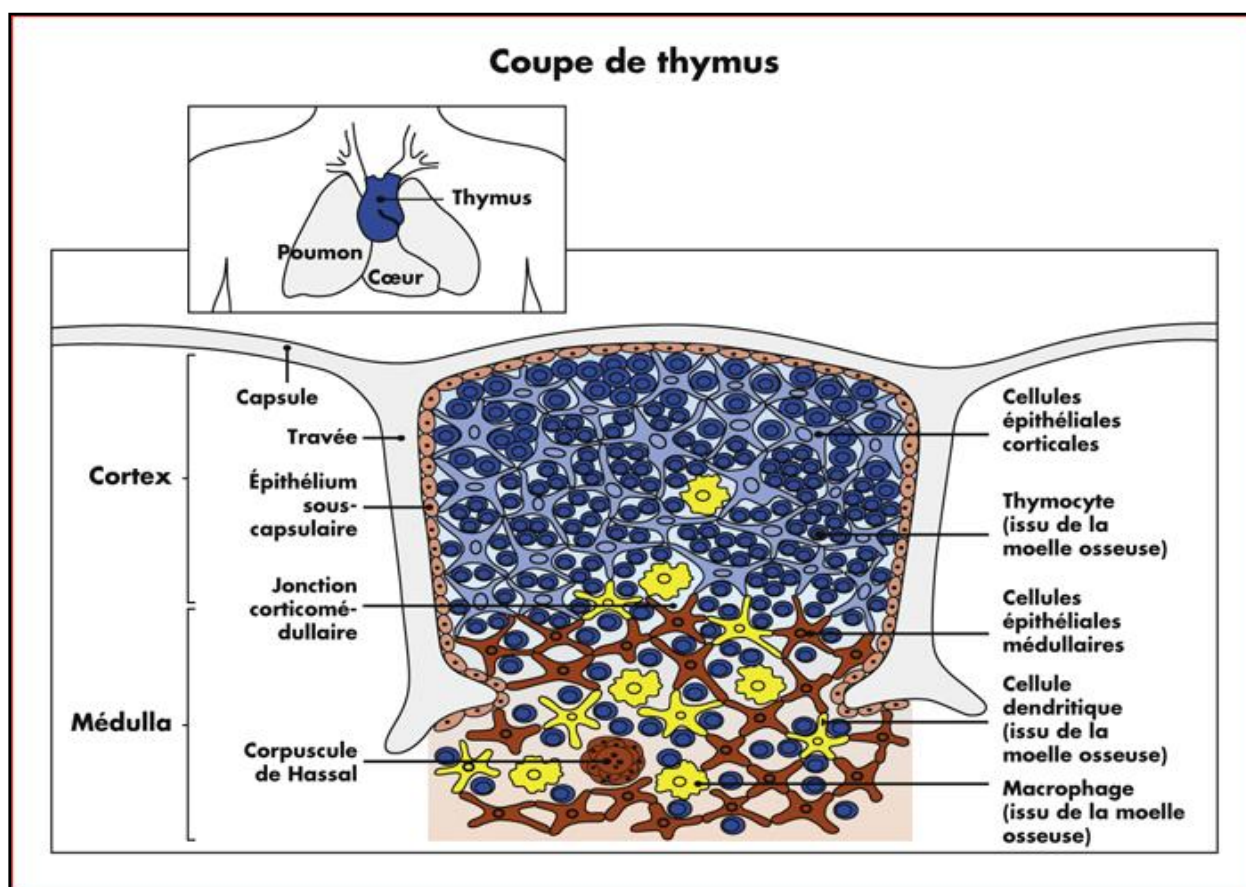


Figure 1.1. Représentation schématique d'une coupe de thymus (Choufi and Lassoued, 2012).

Au niveau du cortex, selon l'expression des marqueurs de surface CD44 et CD25, les thymocytes DN vont subir quatre principales étapes de maturation passant du stade DN1 jusqu'au stade DN4. Le réarrangement des gènes codant la chaîne β du TCR se fait lorsque le thymocyte est entre le stade DN2 et DN3 sous le contrôle des protéines RAG1 (*Recombination-Activating Genes 1*) et RAG2 (Rothenberg et *al.*, 2016).

Au stade DN3, le complexe pré-TCR- $\alpha\beta$ est formé suite à l'appareillage de la chaîne β , conformément réarrangée, avec une chaîne de substitution pT α (pré-T-cell- α) qui assure sa stabilisation. Le réarrangement du locus de la chaîne α se fait dans le stade DN4, et les thymocytes commencent enfin à exprimer le CD8 et le CD4 pour former des thymocytes CD4+CD8+ double positifs (DP). Ces derniers représentent 80 à 90 % des thymocytes présents dans le thymus (Rothenberg et *al.*, 2016).

Après la formation complète du TCR, constitué de chaînes $\alpha\beta$, les lymphocytes T générés doivent être aptes à reconnaître les antigènes pathogènes et les éliminer, sans s'activer à l'égard des composantes naturelles du soi. Pour cela, les bons thymocytes doivent être sélectionnés par des mécanismes de sélection au niveau du thymus, ce processus est appelé la tolérance centrale (Klein et *al.*, 2009). En effet, au cours de ce processus, les thymocytes DP vont entrer en contact avec des cellules présentatrices d'antigène thymiques. Ainsi au niveau du cortex, les thymocytes DP vont subir une première sélection, une sélection positive (Klein et *al.*, 2009), où seuls ceux capables de reconnaître des peptides présentés sur les molécules du CMH par les cellules épithéliales thymiques du cortex (cTEC), (Figure 1.1), sont positivement sélectionnés. Ces derniers se dirigent ensuite vers la medulla thymique pour y subir une deuxième sélection, une sélection négative (Wang et *al.*, 2019). A ce niveau, les cellules dendritiques et les cellules épithéliales thymiques de la medulla (mTEC), (Figure 1.1), vont leurs présenter, des antigènes dérivés du soi, par leurs molécules du CMH, qu'ils peuvent reconnaître par la suite à la périphérie. Afin de limiter l'export des LT autoréactifs, les thymocytes qui possèdent une trop forte affinité pour les complexes CMH-peptides du soi sont éliminés, et les autres deviennent des LT matures simples positifs CD4+ ou CD8+, et sortent enfin du thymus pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires (Klein et *al.*, 2009).

Cependant, même avec un strict contrôle suite à la sélection thymique, des LT autoréactifs se retrouvent parfois à la périphérie. Ces derniers doivent être éliminés par un processus de tolérance en périphérie, principalement suite à l'intervention des lymphocytes Treg (tolérance périphérique) (Kisielow, 2019).

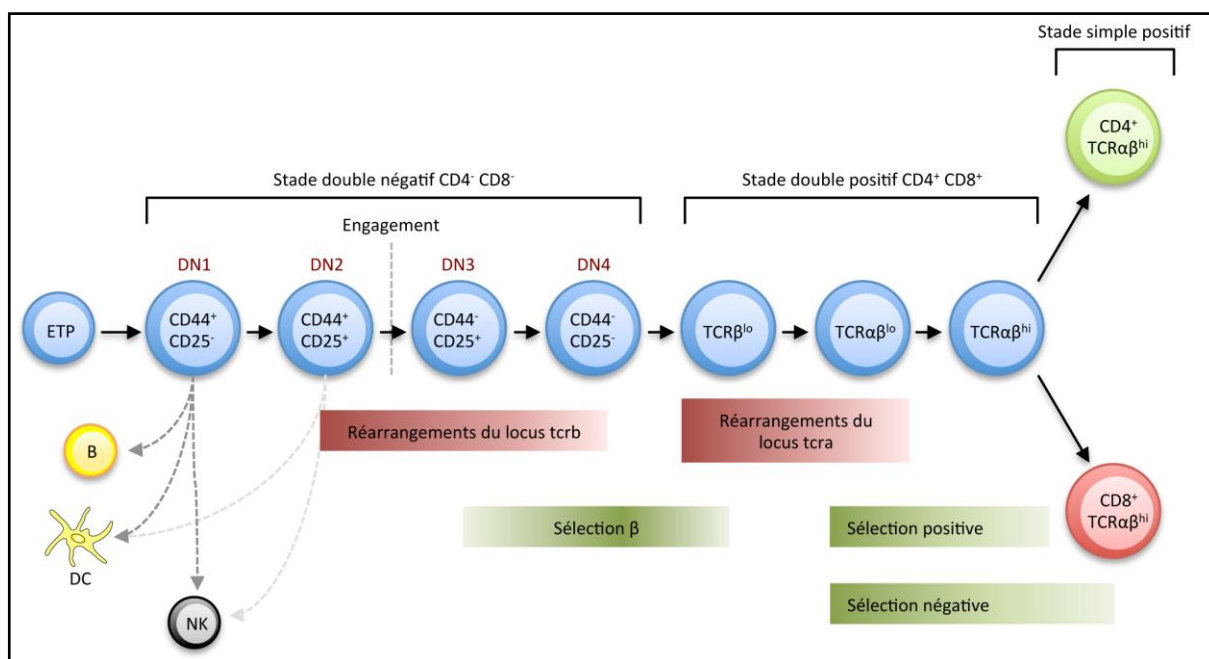


Figure 1.2. Schéma du développement des lymphocytes T $\alpha\beta$ dans le thymus. Les précurseurs hématopoïétiques précoces (ETP) pénètrent dans le thymus et subissent un réarrangement génétique pour exprimer le TCR fonctionnel. Après plusieurs étapes de sélection et de maturation, un seul lymphocyte T CD4 + ou CD8 + positif quitte le thymus et s'installe dans les organes lymphoïdes périphériques.

1.3. Différentiation et polarisation des lymphocytes T helper

Au niveau des organes lymphoïdes secondaires, l'interaction lymphocyte Th-cellule dendritique joue un rôle primordial dans le déroulement et l'articulation de la réponse immunitaire adaptative. En effet, l'engagement du TCR, exprimé par le lymphocyte Th, avec le complexe CMH/peptide spécifique, au niveau de la cellule dendritique, conduit à l'activation du lymphocyte Th, causé par le recrutement de nombreuses molécules de surfaces et de signalisation. La zone de contact entre ces deux cellules est appelée: synapse immunologique (Zhu, 2018).

L'activation des lymphocytes Th est suivie par leur prolifération et différenciation en cellules Th effectrices parmi lesquelles différents lignages sont bien décrits; les lymphocytes T auxiliaires 1 (Th1), les lymphocytes T auxiliaires 2 (Th2), les lymphocytes T auxiliaires 17 (Th17)(Patente et *al.*, 2019) . Chaque lignage a des fonctions typiques, et la différenciation vers un clone spécifique dépend principalement du microenvironnement cytokinique présent lors de l'initiation de la réponse immunitaire (Bi et *al.*, 2019).

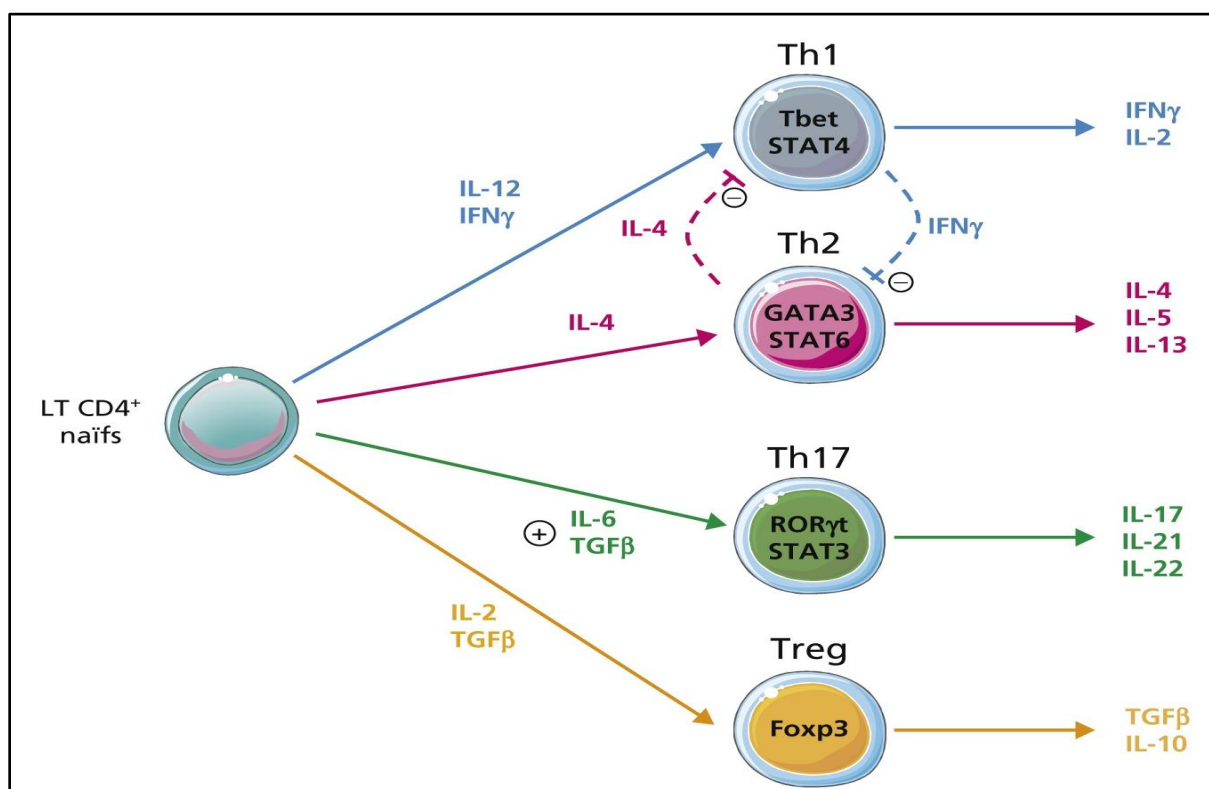


Figure 1.3. Différenciation lymphocytes T helper et facteurs de transcription.

1.4. Les lymphocytes Th1

Les cellules Th1 ont été identifiées à la fin des années 1980 comme un sous-ensemble de cellules T CD4 + qui orchestrent réponses immunitaires adaptatives efficaces contre les pathogènes intracellulaires en sécrétant de l'interféron (IFN) γ qui active les macrophages pour tuer les microbes intracellulaires (Sallusto, 2016). Th1 peut être identifié par l'expression de surface du récepteur de chimiokine CXCR de type 3 (CXCR3) et les chaînes du récepteur de l'interleukine (IL) -12 (IL-12R) β 1 / β 2, ainsi que les chaînes intracytoplasmiques expression du facteur de transcription maître T-bet (Annunziato et al., 2015). IL-12 et IFN- γ coopèrent pour induire l'expression de T-bet qui à son tour induit une expression supplémentaire d'IFN- γ et de T-bet, amplifiant ainsi la polarisation vers un profil Th1.

L'IFN- γ sécrété par les cellules Th1 peut également diriger la commutation isotypique chez les lymphocytes B vers des isotypes IgG2a et IgG3. Ces anticorps vont se fixer aux molécules du complément sur les pathogènes, aidant ainsi leur opsonisation et leur destruction par les phagocytes. Enfin, la sécrétion d'IL-2 et d'IFN- γ par les lymphocytes Th1

peut également engendrer la différenciation des lymphocytes T CD8+ en lymphocytes T cytotoxiques. Les lymphocytes T CD4+ Th1 vont donc avoir un rôle de défense contre les pathogènes intracellulaires (Kunkl et *al.*, 2020).

1.5. Les lymphocytes Th2

Les cellules Th2 sont les lymphocytes cruciaux lors des réponses immunitaires adaptatives aux infections des parasites extracellulaires tels que les helminthes; Les cellules Th2 sont également responsables du développement de certaines maladies inflammatoires asthmatiques et allergiques. En sécrétant IL-4, les cellules Th2 demandent aux cellules B de produire des IgG1 et IgE, en produisant de l'IL-4 et de l'IL-13, les cellules Th2 induisent un macrophage alternativement activé (Zhu et *al.*, 2010). Les cellules Th2 recrutent également des éosinophiles *via* la production d'IL-5 et agissent directement sur les cellules épithéliales et les cellules musculaires lisses grâce à la production d'IL-13. Par conséquent, IL-4, IL-5 et IL-13 sont les principales cytokines effectrices produites par les cellules Th2 pendant les réponses immunitaires de type 2. Les trois gènes de cytokines, *Il4*, *Il5* et *Il13*, sont situés dans un segment génomique, qui est soumis à la régulation de la région de contrôle du locus (LCR) dans le gène *Rad50* (Zhu, 2015).

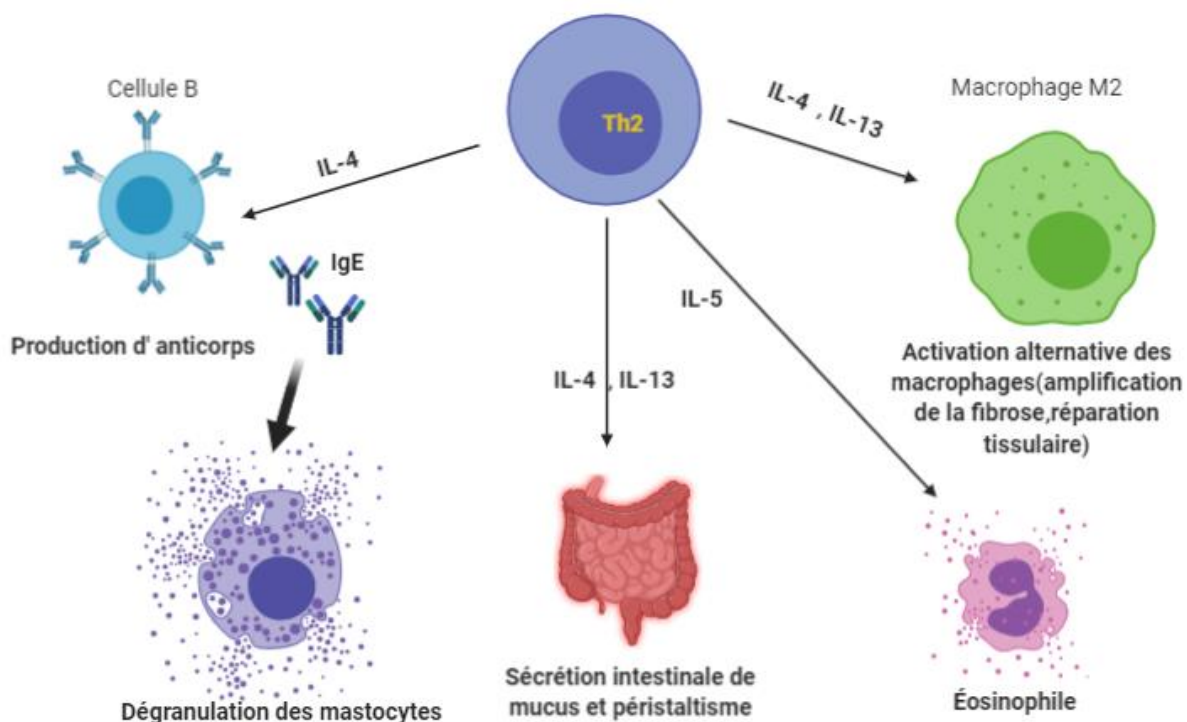


Figure 1.4. Fonctions des cellules TH2.

Pendant l'activation des lymphocytes T CD4 *via* la signalisation et la co-stimulation médiées par les récepteurs des cellules T (TCR), les signaux des cytokines reçus par les cellules T activées sont déterministes dans l'engagement du destin des cellules T. Par exemple, conjointement avec la ligature de TCR, l'activation médiée par IL-4 du transducteur de signal et activateur de la transcription 6 (STAT6) joue un rôle important au cours de la différenciation des cellules Th2 (Finkelman et *al.*, 2000), bien que la différenciation des cellules IL-4-indépendant Th2 peut se produire dans l'absence de signalisation de l'IL-4 dans certaines conditions *in vivo* (van Panhuys et *al.*, 2008).

La différenciation de Th2 dépendante de l'IL-4 et indépendante de l'IL-4 nécessite le facteur de transcription clé GATA-3 (Scheinman and Avni, 2009), qui est responsable des changements épigénétiques dans de nombreux locus géniques spécifiques de Th2 et de l'activation directe de la transcription. De plus, l'activation médiée par IL-2 de STAT5 est indispensable pour la production de cytokines Th2, éventuellement par le remodelage de la chromatine du locus de cytokine Th2 ainsi que pour maintenir l'expression de GATA3 dans les cellules Th2 déjà différenciées. Par conséquent, la régulation positive de GATA3 et l'activation de STAT5 sont les deux événements clés pour la différenciation des cellules Th2. La différenciation des cellules Th2 et l'induction des cytokines Th2 sont également régulées par de nombreux autres facteurs de transcription, notamment les membres de la famille NFAT, NF κ B et AP-1. Les mécanismes de renforcement de la différenciation des cellules Th2 comprennent des rétroactions positives, l'inhibition d'autres choix de lignées alternatifs et la croissance sélective des cellules Th2 différenciées (Cote-Sierra et *al.*, 2004).

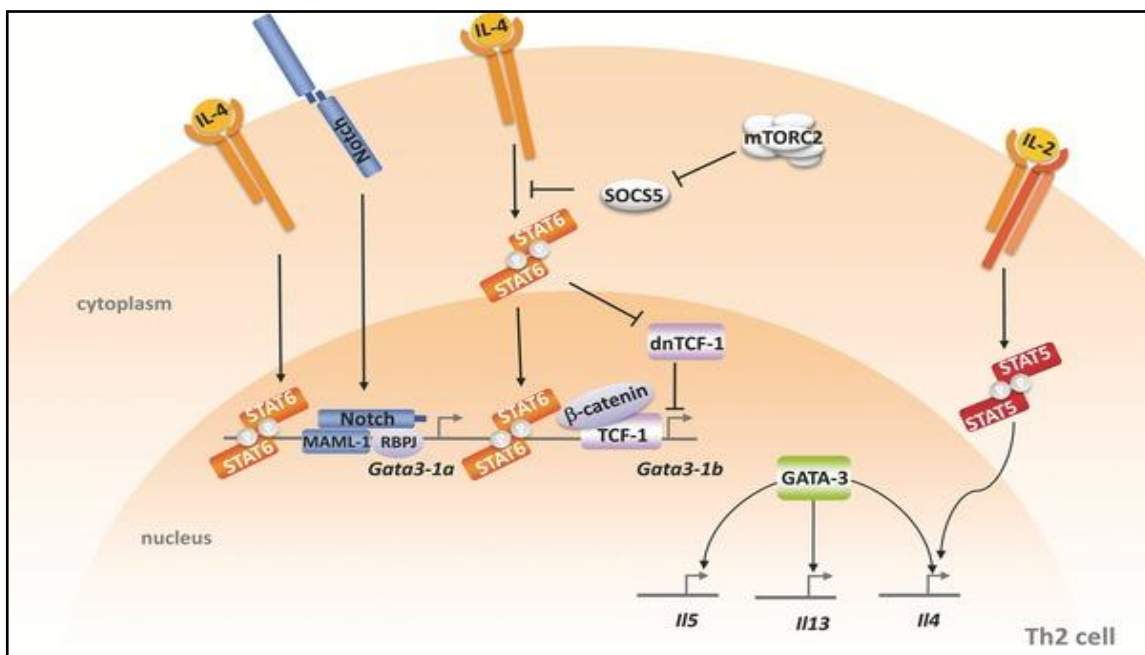


Figure 1.5. Voies de signalisation dans la différenciation Th2.

1.6. Régulation croisée de la différenciation des auxiliaires en T

Une contre-régulation mutuelle entre les réponses Th1 et Th2 existe. Tant que le profil Th2 est activé, le profil Th1 est inhibé, et vice versa. En effet, le développement de la lignée Th1 est inhibé suite à l'inhibition de la production d'IL-12 essentiellement par l'IL-4 produit par les clones Th2 alors que le développement des cellules Th2 est inhibé par l'IFN- γ libéré par les cellules Th1 (Zhu and Paul, 2008).

De plus, les facteurs de transcription spécifiques impliqués dans la différenciation des clones Th1/Th2 jouent un rôle important dans cette régulation réciproque. En effet, les facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des clones Th1 inhibe la différenciation Th2 comme Runx3 qui réprime la transcription de l'IL-4, et T-bet qui diminue l'expression du GATA-3 (Kohu et al., 2009). Ce dernier, impliqué dans la différenciation de la lignée Th2, inhibe à son tour l'activation du STAT4 et l'expression du récepteur β de l'IL-12. L'expression du T-bet et la production de l'IFN- γ sont inhibés par STAT5 et Gfi-1 (Zhu and Paul, 2010).

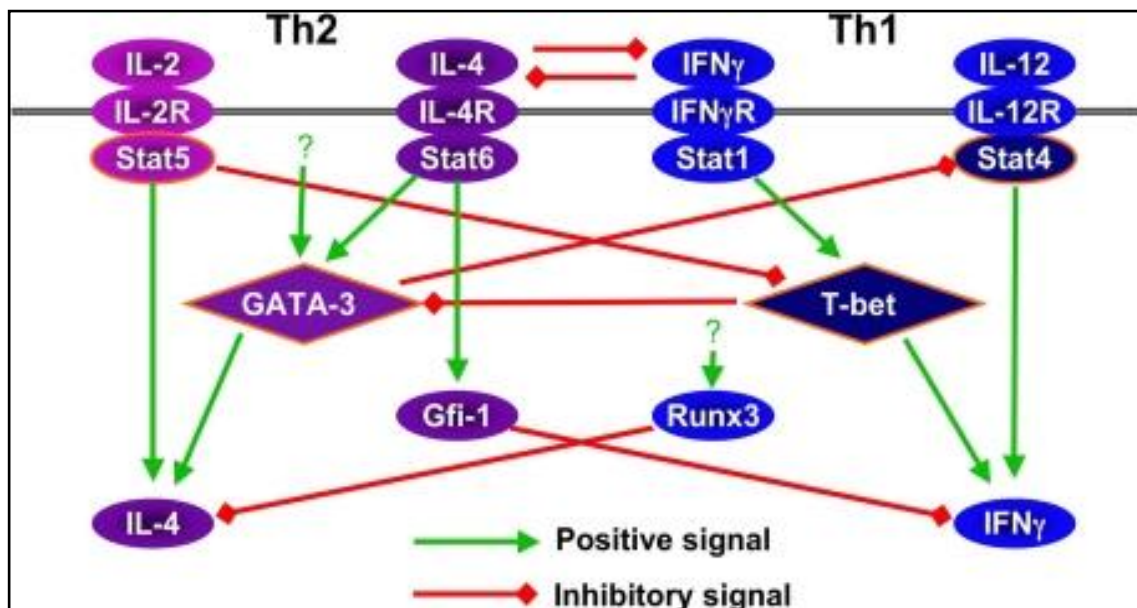


Figure 1.6. Régulation croisée entre les facteurs impliqués dans la différenciation Th1 et Th2.

1.7. Déséquilibre de la balance Th1/Th2

L'équilibre immunitaire contrôlé par T helper 1 (Th1) et T helper 2 (Th2) est crucial pour l'immunorégulation et son déséquilibre provoque diverses maladies immunitaires dont l'asthme allergique. Par conséquent, le diagnostic de l'équilibre Th1 / Th2 dans les maladies auto-immunes, y compris l'asthme, est essentiel pour l'application de médicaments régulateurs de l'équilibre immunitaire (Asayama *et al.*, 2020). L'équilibre Th1 / Th2 n'est pas seulement contrôlé par les cellules Th1 et les cellules Th2, mais aussi par divers facteurs régulateurs, dont les lymphocytes T régulateurs, le facteur sexuel, les chimiokines, les facteurs de transcription, la voie de transduction du signal (STAT6), etc. De ce point de vue, la conception de l'«équilibre Th1 / Th2» ressemble à l'équilibre du yin et du yang qui est le concept principal de la médecine traditionnelle coréenne pour le traitement des maladies (Lee, 2008).

2. Gène *GATA3*

2.1. Définition

Le gène *GATA3* (GATA binding protein 3) est un gène qui code pour une protéine qui appartient à la famille GATA des facteurs de transcription (Rao *et al.*, 2020). Cette protéine possède deux doigts de zinc de type GATA. Le gène *GATA3* est un régulateur fondamental dans le développement des cellules Th2. Les défauts de ce gène sont à l'origine d'une hypoparathyroïdie avec surdité neurosensorielle et dysplasie rénale. Le gène *GATA3* contient 8 exons localisé sur le chromosome 10 (10p14) il code pour une protéine longue de 443 acides aminés (Yang *et al.*, 2020).

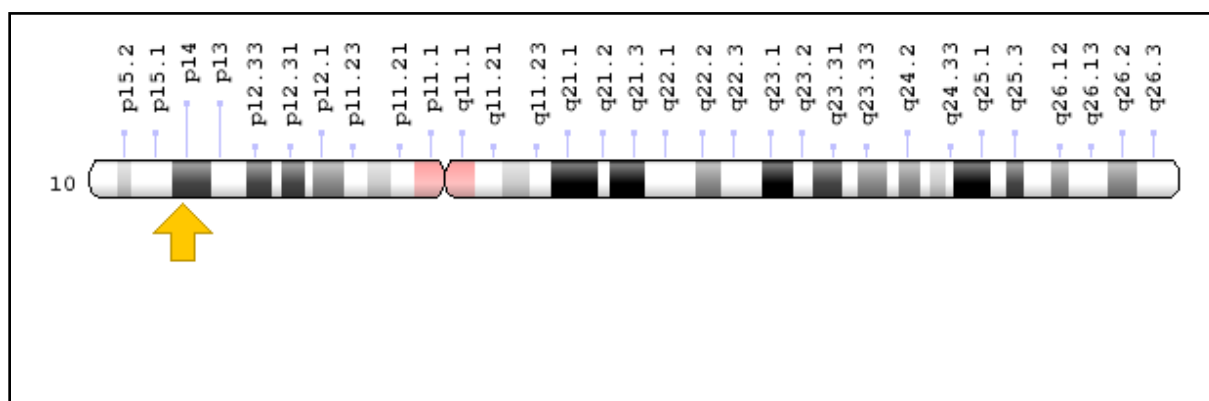


Figure 1.7. Localisation du gène *GATA3* sur le chromosome 10 humain.

L'expression de *GATA3* est requise pour le développement normal de la glande mammaire où elle est estimée être le facteur de transcription le plus abondant dans les cellules épithéliales luminales. Dans le cancer du sein, l'expression de *GATA3* est fortement corrélée avec le programme de transcription luminaire (Takaku et *al.*, 2015). Une analyse génomique récente des cancers du sein humain a révélé une mutation à haute fréquence de *GATA3* dans les tumeurs luminales (Takaku et *al.*, 2018).

2.2. Protéine *GATA3* dans le complexe du facteur de transcription

La famille GATA de facteurs de transcription sont des protéines conservées qui contiennent un ou deux motifs à doigts de zinc de type C2-C2 qui reconnaissent la séquence d'ADN consensus WGATAR (où W désigne A ou T et R désigne A ou G) (Van de Walle et *al.*, 2016). Les six membres de la famille des mammifères GATA (*GATA1* à *GATA6*) contiennent deux motifs à doigts de zinc, probablement dus à la duplication de gènes. Les différentes protéines GATA ont des profils d'expression tissulaire distincts et restreints et peuvent être divisées en facteurs hématopoïétiques (*GATA1*, *GATA2* et *GATA3*) et en facteurs endodermiques (*GATA4*, *GATA5* et *GATA6*) (Van de Walle et *al.*, 2016).

Les protéines GATA ont une structure commune, qui comprend des régions N-terminales distinctes qui ont une activité transactivatrice, des motifs à doigts de zinc hautement conservés dans la région C-terminale, des régions de base conservées situées immédiatement après le deuxième doigt de zinc et des régions C-terminales distinctes de longueurs variables (Romano and Miccio, 2020).

GATA3 est le principal membre de la famille GATA qui est exprimé par les cellules immunitaires et peut être facilement détecté dans les cellules T en développement et matures, les cellules tueuses naturelles (NK) et les cellules NKT restreintes aux CD1 (Samson et *al.*, 2003). En effet, plusieurs études récentes ont révélé un rôle émergent pour *GATA3* dans les cellules NKT invariantes. En revanche, les mastocytes matures expriment *GATA1* et *GATA2* mais pas *GATA3*. Au-delà du système immunitaire, *GATA3* est exprimé dans de nombreux tissus embryonnaires et adultes, y compris les glandes surrénales, les reins, le système nerveux central, l'oreille interne, les follicules pileux, la peau et les tissus mammaires, et des fonctions importantes dans plusieurs de ces tissus ont été démontrées par modèles de souris à élimination conditionnelle (Liao et *al.*, 2017).

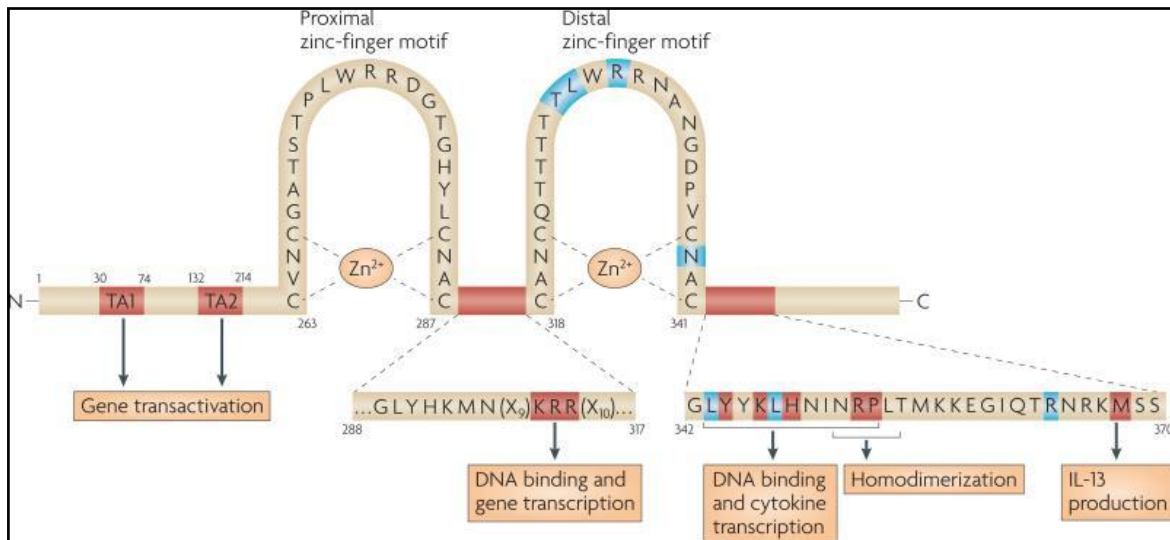


Figure 1.8. Domaines fonctionnels et acides aminés essentiels dans la souris GATA3. La protéine 3 de liaison à GATA (GATA3) a deux domaines de transactivation amino-terminaux TA1 et TA2, et deux motifs à doigts de zinc, qui sont chacun suivis d'une région basique conservée. Le motif C-terminal (proximal) à doigts de zinc lie le motif canonique GATA, WGATAR (où W désigne A ou T et R désigne A ou G). Le motif à doigts de zinc N-terminal (distal) semble avoir une spécificité plus large, de sorte que la quatrième position du motif GATA peut être n'importe quel nucléotide (Van de Walle et *al.*, 2016).

Tableau 1.1. La fonction de GATA3 dans divers tissus.

Tissu	Fonctions de GATA3
Cellule T	Spécifications des cellules Th2.
	Survie cellulaire lors de la sélection β .
	Transforme les cellules T en coopération avec c-Myc et Notch.
Peau	Différenciation des précurseurs de la gaine radiculaire interne.
	Diminue la prolifération basocellulaire.
	Rôle inconnu dans le cancer de la peau.
Glande mammaire	Spécifie et maintient la différenciation, l'adhésion, la prolifération des cellules luminales.
	Une faible expression de GATA3 est en corrélation avec un pronostic de cancer du sein moins bon.
	La réintroduction dans les cellules cancéreuses supprime les métastases pulmonaires.
Les reins	Empêche la formation de canaux rénaux métanéphriques ectopiques.
	L'haploinsuffisance entraîne une dysplasie rénale.
	Rôle inconnu dans le cancer du rein.
Lentille	Différenciation des cellules de fibre de lentille.
	Régule le cycle cellulaire pour supprimer la prolifération cellulaire.
Les neurones	Maintient les niveaux de noradrénaline pendant le développement en régulant à la hausse la dopamine β -hydroxylase.
	Différenciation des neurones ganglionnaires sympathoadrénaux et auditifs.
	Exprimé dans plusieurs zones du cerveau, bien que sa fonction soit encore inconnue.
Adipocyte	Antagonise la différenciation des adipocytes.
	Perte de fonction associée à l'obésité.

2.3. GATA3 dans la différenciation et la fonction des cellules Th2

Dans les cellules immunitaires, GATA3 est surtout connu pour fonctionner comme un maître régulateur de la différenciation des cellules T helper 2 (Th2). Cependant, ces dernières années, le GATA3 s'est avéré avoir des fonctions cruciales supplémentaires dans l'engagement précoce des cellules T, la β sélection et le développement des cellules T CD4⁺ (Amsen et *al.*, 2007).

Les cellules Th déficientes en GATA3 ont montré un profond défaut dans leur capacité à se différencier en cellules Th 2 et se sont plutôt différenciées en cellules productrices d'IFN γ même dans des conditions optimisées pour une polarisation Th2. Il est intéressant de noter, cependant, que GATA3 s'est avéré nécessaire pour la production continue d'IL-5 et d'IL-13, mais qu'il n'était pas nécessaire pour maintenir l'expression d'IL-4 et d'IL-10 par les cellules Th2 (Saravia et *al.*, 2019).

2.3.1. Voie dépendante de STAT6

Le rôle de GATA3 dans la différenciation des cellules Th2 est bien connu, en raison de l'induction de l'expression de GATA3 par la cytokine IL-4 induisant les cellules Th2 dans un transducteur de signal et un activateur de manière dépendante de la transcription 6 (STAT6). La ligature du TCR dans des cellules T CD4⁺ naïves conduit à une régulation positive des niveaux d'ARNm d'IL4 en quelques heures et des niveaux d'ARNm de *Gata3* en 24 heures. GATA3 facilite la conversion du locus du gène *IL4 - IL5 - IL13* en une conformation « ouverte », qui permet à d'autres facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des cellules Th2 pour accéder à ce locus (Saravia et *al.*, 2019). Il inhibe également l'expression de l'interféron- γ (IFN γ) et transactive directement les gènes *IL5* et *IL13*. Une boucle de rétroaction positive qui induit davantage l'expression de GATA3 et renforce la différenciation des cellules Th2 est établie par la production de niveaux élevés d'IL-4 et l'auto-activation de l'expression de GATA3. La source de l'IL-4 initiale qui initie la boucle de rétroaction positive dépendante de STAT6 pendant les réponses *in vivo* des cellules Th2 est encore un sujet de débat. Les données actuelles suggèrent que les cellules T mémoire CD44⁺ CD4⁺ et les cellules T CD4⁺ naïves et les cellules immunitaires innées, telles que les basophiles, peuvent toutes contribuer à la source initiale d'IL-4 (Saravia et *al.*, 2019).

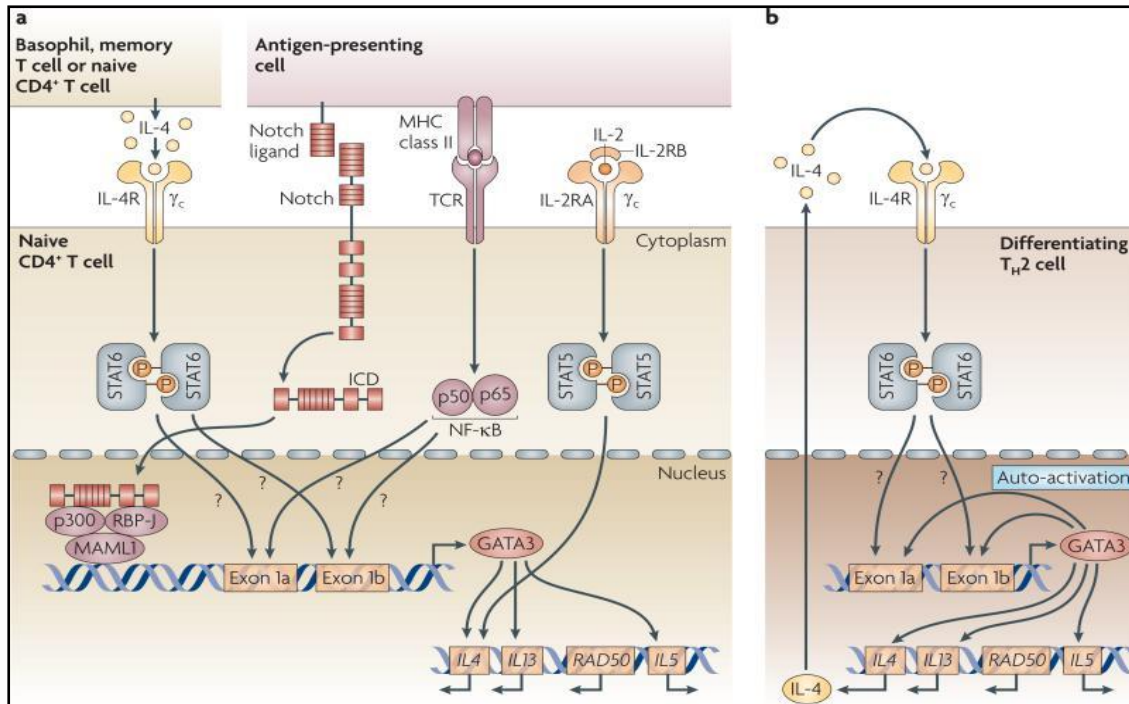


Figure 1.9. GATA3 est requis à la fois pour les voies dépendantes de STAT6 et indépendantes de STAT6 de la différenciation des cellules TH2. La différenciation des cellules Th2 peut être initiée par IL-4 dérivée des cellules Th activées via le transducteur de signal et l'activateur de la signalisation dépendante de STAT6 et la régulation à la hausse de la protéine de liaison au GATA3. La différenciation des cellules Th2 peut également être initiée indépendamment de la signalisation du récepteur IL-4 (IL-4R). Divers ligands Notch exprimés par des cellules présentatrices d'antigènes peuvent interagir avec Notch des cellules T CD4 +naïf, conduisant au clivage de Notch transmembranaire pour libérer le domaine intracellulaire actif de Notch (ICD).

2.3.2. Voie indépendante de STAT6

L'observation selon laquelle la différenciation des cellules Th2 peut encore se produire, bien qu'à une efficacité nettement réduite, en l'absence de STAT6 conduit à suggérer qu'il existe des voies indépendantes de STAT6 de la différenciation des cellules Th2 et de l'expression de GATA3. Conformément à cette idée, deux études récentes indiquent que les signaux Notch régulent directement la transcription de *Gata3* et sont essentiels pour induire une réponse des cellules Th2 (Fang et al., 2007).

L'expression forcée du domaine intracellulaire de Notch a augmenté la production d'IL-4 et l'expression de GATA3, même dans les cellules T déficientes en STAT6. Notch intracellulaire et GATA3 se sont avérés synergiser dans l'induction de l'expression de GATA3 et IL-4, par le biais d'un mécanisme indépendant de STAT6. Bien que GATA3 puisse induire une différenciation des cellules TH2 indépendamment de la signalisation Notch, l'effet de promotion des cellules TH2 des signaux Notch nécessite GATA3, car la surexpression de Notch intracellulaire dans les cellules TH qui sont déficientes en GATA3 ou qui expriment

une forme dominante négative de GATA3 a résulté en très faible production d'IL-4 (Amsen et *al.*, 2007).

Ensemble, ces études indiquent que les signaux de polarisation des cellules Th2 autres que l'IL-4 peuvent favoriser la différenciation des cellules Th 2 par des mécanismes indépendants de STAT6: les signaux Notch, en stimulant l'expression de GATA3 (et par la suite IL-4), et les signaux IL-2R – STAT5, en induisant directement la production d'IL-4 dans les cellules T naïves nouvellement activées. Ces données, montrant que les heures de production d'IL-4 après le déclenchement du TCR sont abrogées dans les cellules T naïves déficientes en GATA3, indiquent que les voies de production d'IL-4 dépendantes de STAT6 et indépendantes de STAT6 nécessitent GATA3 (Yamane et *al.*, 2005).

2.4. Régulation transcriptionnelle par GATA3

GATA3 contrôle la fonction cellulaire principalement en régulant l'expression du gène cible. Par exemple, pour favoriser la différenciation Th2, GATA3 active l'expression des cytokines Th2 en se liant directement aux promoteurs *Il5* et *Il13*, aux régions intragéniques de *Il4* et à la région *CGRE* dans le locus *Il13*. Pour inhiber la différenciation Th1, GATA3 supprime l'expression d'IL12R β 2 et STAT4, qui sont tous deux critiques pour la différenciation Th1. De plus, GATA3 inhibe l'expression des Eomes et la production d'IFN- γ en interagissant physiquement avec Runx3, un régulateur transcriptionnel qui favorise la différenciation Th1. Pour révéler les cibles de GATA3 dans les cellules T, une analyse à l'échelle du génome a été réalisée en utilisant une combinaison d'approches ChIP-Seq et RNA-Seq, qui permettent l'identification de séquences d'ADN liées par des complexes protéiques contenant GATA3 ainsi que le profilage des Expression d'ARN (Gibbons et *al.*, 2018).

De nombreux sites de liaison à GATA3, par exemple ceux des loci *Ctla4* et *Icos*, sont partagés par différents sous-ensembles de cellules T, y compris les thymocytes, CD4 + T, CD8 + T, les cellules Treg, les cellules Th1, Th2, Th17 et NKT. Néanmoins, GATA3 régule différents programmes de transcription en fonction du contexte cellulaire. Par exemple, GATA3 régule directement l'expression des sous-unités Th-POK, Notch1 et TCR spécifiquement dans les thymocytes et les cellules T naïves, et il contrôle l'expression distincte de 91, 90, 7 et 43 gènes dans Th1, Th2, Th17, et les cellules iTreg respectivement. GATA3 déploie ainsi des mécanismes partagés et uniques pour contrôler la fonction des différents sous-ensembles de cellules T. Pour atteindre une fonction diversifiée dans différents types de cellules, GATA3 s'associe à divers co-facteurs, y compris ETS, RUNX, AP1, TCF11 et FLI1 d'une manière spécifique au type de cellule, soit pour réguler

directement l'expression du gène cible soit pour modifier les marqueurs épigénétiques, tels que la méthylation de la histon (Ohmura et *al.*, 2016).

2.5. GATA3 et cancer du sein

GATA3 est un marqueur proéminent du modèle luminal d'expression génique, la perte d'expression de GATA3 est associée à des types de tumeurs avec une propension à la croissance invasive et un mauvais pronostic. Mécaniquement, cette relation semble provenir de deux propriétés de GATA3. Premièrement, GATA3 et ER- α participent à un bilan positif boucle de rétroaction, chacune stimulant l'expression de l'autre. Deuxièmement, GATA3 a été identifié comme un régulateur négatif important des caractéristiques tumorales associées à mauvais pronostic. Dans les lignées cellulaires humaines et chez l'animal, GATA3 a supprimé l'expression des facteurs critiques à la transition épithéliale vers mésenchymateuse et métastase. Expression GATA3 forcée dans un modèle de souris pour le cancer du sein (virus du polyome entraîné par MMTV au milieu Antigène T) a entraîné une différenciation accrue et une diminution des métastases (Takaku et *al.*, 2018).

Ces expressions et les données du système modèle indiquent que GATA3 peut jouer un rôle dans cancer du sein associé à la promotion de la croissance (par stimuler l'expression d'ER- α) ainsi que dans le maintien d'un phénotype à pronostic favorable. La publication initiale de l'Atlas du génome du cancer projet a identifié 55 mutations somatiques GATA3 (un total de de 10,7% de tous les patients) dans leur cohorte de 512 séquences tumeurs. Pratiquement toutes les mutations (53 sur 55) ont été trouvées pour impacter les exons 5 et 6 de la protéine GATA3, qui codent pour le deuxième doigt de zinc et l'extrémité carboxyle relativement peu étudiée. Trois grandes classes de mutations ont été décrites: (1) des mutations du site d'épissage au jonction exon 4/5 et jonction exon 5/6, (2) décalage de cadre mutations dans l'exon 6 et (3) mutations de décalage de cadre dans le zinc doigt 2. Les mutations du site d'épissage à la jonction exon 4/5 (total TCGA rapporte que TCGA a tous une CA suppression du côté de l'accepteur d'épissure de 5 kb environ intron entre les exons 4 et 5 (Takaku et *al.*, 2015).

Ce dinucléotide CA particulier se trouve immédiatement à côté du nucléotide terminal de l'intron dans l'accepteur consensus site: (riche en Y) - N - C - A - G - [couper] - G. Examen des lectures d'ARN seq de ces tumeurs révèle que dans 11 sur 12 cas, le site accepteur d'épissage est déplacé par la suppression de l'AC générant un nouveau site accepteur d'épissage 7 nucléotides en *aval*. L'utilisation de ce nouvel accepteur d'épissage

entraîne un nouveau cadre de lecture dans l'exon 5, inclusion de 44 acides aminés faux-sens, suivie d'un arrêter le codon. Ces événements, survenant dans 20% des tumeurs avec la mutation GATA3, entraînent la perte du doigt de zinc 2 et perte de l'extrémité carboxyle de GATA3 de type sauvage. Celles-ci les mutations du site accepteur d'épissage sont exclusives à Luminal Une tumeur. Étant donné l'exigence de ZF2 pour productive reconnaissance de l'élément de consensus GATA, cette classe de protéines mutantes devrait manquer de liaison spécifique à l'ADN capacité. Si les produits protéiques sont stables dans les cellules et si aucune protéine tronquée peut dimériser avec GATA3 de type sauvage est actuellement inconnue (Karn and Isaac, 2019).

3. PCR

3.1. Définition

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) a été inventée par Mullis en 1983 et brevetée en 1985. Son principe est basé sur l'utilisation de l'ADN polymérase qui est une réplication in vitro de séquences d'ADN spécifiques. Cette méthode peut générer des dizaines de milliards de copies d'un fragment d'ADN particulier (la séquence d'intérêt, l'ADN d'intérêt ou l'ADN cible) à partir d'un extrait d'ADN (modèle d'ADN). La PCR peut amplifier les signaux du bruit de fond, c'est donc une méthode de clonage moléculaire (Kadri, 2020).

3.2. Principe de la PCR

La PCR permet d'obtenir plusieurs copies de fragments d'ADN à partir d'extraits par réplication in vitro. L'ADN matrice peut être de l'ADN génomique ou de l'ADN complémentaire obtenu à partir d'extraits d'ARN messenger par RT-PCR, voire d'ADN mitochondrial. Il s'agit d'une technique utilisée pour obtenir un grand nombre de séquences d'ADN spécifiques à partir d'échantillons d'ADN. Cette amplification est basée sur la réplication de matrices d'ADN double brin. La PCR est divisé en trois étapes: étape de dénaturation, étape d'hybridation avec amorces et étape d'élongation. Le produit de chaque étape de synthèse peut être utilisé comme modèle pour les étapes suivantes, ainsi l'amplification exponentielle est obtenue (Rahman et al., 2013).

La réaction en chaîne par polymérase est effectuée dans un mélange réactionnel qui contient l'extrait d'ADN (ADN matrice), la Taq polymérase, les amorces et les quatre désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) en excès dans une solution tampon. Les tubes contenant la réaction du mélange sont soumis à des dizaines de cycles de température répétés dans le bloc chauffant du thermocycleur (appareil qui a une enceinte où les tubes d'échantillons sont déposés et dans lequel la température peut changer, brusquement de 0 à 100 ° C par effet Peltier) (Kadri, 2020). L'appareil permet de programmer la durée et la succession des cycles d'étapes de température. Chaque cycle comprend trois phases de quelques dizaines de secondes. Le processus de la PCR est divisé en trois étapes (Rahman et *al.*, 2013).

3.3. Etapes

- **La dénaturation**

C'est la séparation des deux brins d'ADN, obtenue en élevant la température. La première période est réalisée à une température de 94 °C, appelée température de dénaturation. A cette température, l'ADN matriciel utilisé comme matrice lors de la réplication est dénaturé, les liaisons hydrogène ne peuvent pas être maintenues à des températures supérieures à 80 °C et l'ADN double brin est dénaturé en ADN simple brin (simple brin ADN) (Ahrberg et *al.*, 2016).

- **Hybridation**

La deuxième étape est l'hybridation. Elle est réalisée à une température habituellement comprise entre 40 et 70 °C, appelée température d'hybridation des amorces. La baisse de température permet de reformer les liaisons hydrogène pour que les brins complémentaires puissent s'hybrider. Les amorces, courtes séquences simple brin complémentaires aux régions qui flanquent l'ADN à amplifier, s'hybrident plus facilement que l'ADN à matrice à long brin. Plus la température d'hybridation est élevée, plus l'hybridation est sélective et plus la spécificité est élevée (Ahrberg et *al.*, 2016).

- **L'élongation : 72 °C**

La troisième phase est réalisée à une température de 72 °C, appelée température d'élongation. C'est la synthèse du brin complémentaire. À 72 °C, La Taq polymérase se lie à

Chapitre 1. Revue de la littérature

l'ADN simple brin amorcés et utilise le désoxyribonucléoside triphosphate présent dans le mélange réactionnel pour catalyser la réplication (Ahrberg et *al.*, 2016). Les trois étapes forment un cycle. La PCR se fait entre 30 et 40 cycles.

La PCR permet d'amplifier des séquences dont la taille est inférieure à 6 kilobases. La réaction de PCR est extrêmement rapide, elle ne dure que quelques heures (2 à 3 heures pour une PCR de 30 cycles) (Kadri, 2020).

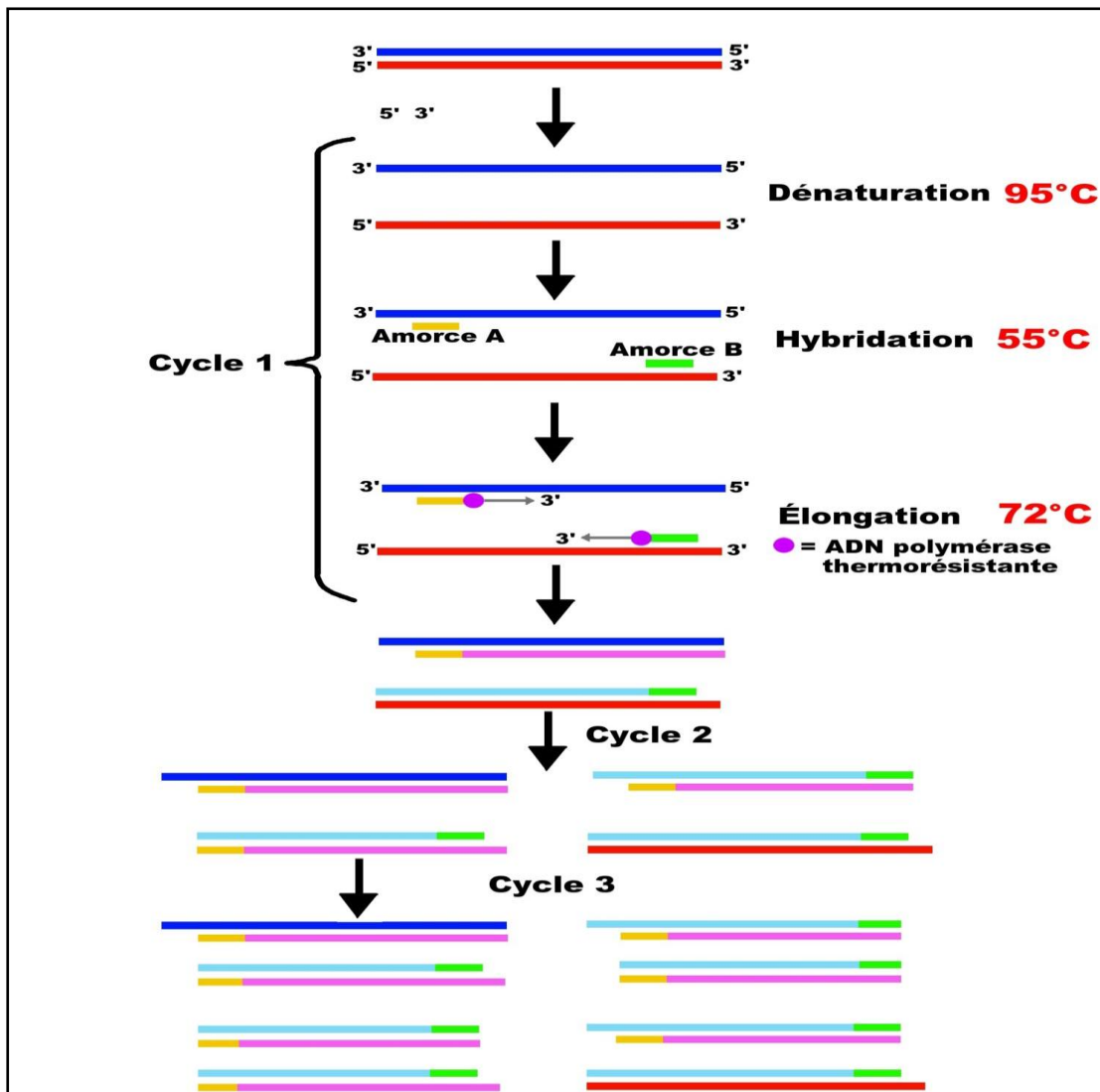


Figure 1.10. Etapes d'amplification par PCR d'une ADN cible.

3.4. Acteur de PCR

- **L'acide nucléique** : généralement forme de double brin ; il contient la séquence cible (Kadri, 2020).
- **Deux amorces, sens et anti sens** : c'est d'oligonucléotides sont spécifique pour le gène cible (Kadri, 2020).
- **Enzyme** : la Taq polymérase est une ADN polymérase thermorésistant dérivée de la bactérie *thermophile thermus aquaticus* sert à la synthèse d'un brin complémentaire via l'addition séquentielle de désoxynucléotide (Kadri, 2020).
- **Désoxynucléotides tri phosphates (dNTPs)** : sont dGTP , dATP , dTTP , dCTP servent une mémoire pour Taq polymérase pour synthétisé le nouveau brin (Kadri, 2020) .

3.5. Choix d'amorces

Dans la mise au point de la réaction PCR, le choix des amorces est crucial. Elles vont avoir un double rôle : en s'hybridant à l'ADN matrice, elles délimitent la région d'ADN à amplifier (étape 2 du cycle) et avec leur extrémité 3'OH libre elles servent d'amorce pour l'ADN polymérase (étape 3 du cycle) (Elkins, 2015).

Il existe de nombreux programmes informatiques conçus pour faciliter la conception de paires d'amorces. L'outil de conception NCBI Primer <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> et Primer3 <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/> sont des sites Web recommandés à cet effet. (Lorenz, 2012).

Cependant, plusieurs caractéristiques doivent être prises en compte lors de la conception des amorces, telles que: (Lorenz, 2012).

1. La longueur de l'amorce doit être de 15 à 30 résidus nucléotidiques (bases).
2. La teneur optimale en GC doit être comprise entre 40% et 60%.
3. L'extrémité 3 'de l'amorce doit contenir G ou C pour serrer l'amorce et empêcher la "respiration" de l'extrémité, augmentant ainsi l'efficacité de l'amorce. Lorsque les

extrémités ne restent pas recuites mais sont usées ou séparées, une «respiration» d'ADN se produit. Les trois liaisons hydrogène de la paire GC aident à prévenir la respiration et peuvent également augmenter la température de fusion de l'amorce.

4. Les extrémités 3' d'un ensemble d'amorces, qui comprend une amorce à brin plus et une amorce à brin moins, ne doivent pas être complémentaires l'une de l'autre, et l'extrémité 3' d'une seule amorce ne peut pas être complémentaire à d'autres séquences d'amorces. Ces deux situations conduisent à la formation de dimères d'amorce et de boucles en épingle à cheveux, respectivement.
5. La différence de T_m final des deux amorces ne doit pas dépasser 5 °C.
6. Les répétitions de di-nucléotides (par exemple, GCGCGCGCGC ou ATATATATAT) ou les analyses à base unique (par exemple, AAAAA ou CCCCC) doivent être évitées car elles peuvent provoquer un glissement le long du segment amorcé de l'ADN et / ou des structures de boucles en épingle à cheveux. Si cela est inévitable en raison de la nature de la matrice d'ADN, alors n'incluez que des répétitions ou des analyses de base unique avec un maximum de 4 bases.

4. Problématique et objectif

4.1. Problématique

Les cellules Th2 sont cruciales dans les réponses immunitaires adaptatives aux infections dues aux parasites extracellulaires tels que les helminthes, elles sont également responsables du développement de certaines maladies inflammatoires asthmatiques et allergiques. En sécrétant IL-4, les cellules Th2 suscitent l'activation des cellules B pour la production des IgG1 et IgE, suite à la libération de IL-4 et de l'IL-13 les cellules Th2 induisent un macrophage alternativement activé. Les cellules Th2 recrutent également des éosinophiles *via* la production d'IL-5, et agissent directement sur les cellules épithéliales et les cellules musculaires lisses grâce à la production d'IL-13. Il a été démontré que GATA3 est le principal facteur de transcription pour la différenciation des cellules Th2. Par ailleurs, les cellules Th déficientes en GATA3 ont montré un profond défaut dans leur capacité à se

différencier en cellules Th2 et se sont plutôt différenciées en cellules productrices d'IFN γ même dans des conditions optimisées pour une polarisation Th2. Ce qui suggère que l'expression de GATA3 est primordiale pour la différenciation des cellules Th2.

Dans cette optique, nous nous sommes focalisés sur le gène GATA3, pour lequel on a élaboré des amorces en utilisant l'outil Primer-BLAST.

4.2. Objectif

L'élaboration des séquences d'oligonucléotides qui serviront d'amorces à l'amplification du gène *GATA3* par PCR.

4.3. But

Ce travail consiste à concevoir des amorces spécifiques au gène GATA3 impliqué dans la polarisation des Th2.

Chapitre 2. Matériels et méthodes

2.1 . Conception des amorces pour la PCR

Lors de la conception d'un ensemble d'amorces à une région spécifique de l'ADN pour l'amplification, une amorce doit être orientée dans le sens 5' → 3', l'autre amorce doit compléter le brin moins, elle est orientée dans le sens 3' → 5' (Ahrberg et al., 2016).

La conception des amorces est sans doute le paramètre le plus important pour le succès de la PCR, une amorce mal conçue peut empêcher le fonctionnement de la réaction PCR. La séquence d'amorce détermine plusieurs paramètres, telles que la position et la longueur du produit, sa température de fusion et finalement le rendement (Elkins, 2015).

Les caractéristiques qui devraient être considérés lors de la conception des amorces sont:

1. La longueur de l'amorce, qui doit être comprise entre 15-30 résidus nucléotidiques (bases).
2. La teneur optimale en GC devrait se situer entre 40-60%.
3. L'extrémité 3' des amorces devrait contenir un G ou C.
4. Températures de fusion optimales (T_m) des amorces entre 52-58°C.
5. Di-nucléotidiques répétitions (par exemple, ou GCGCGCGCGC ATATATATAT).

2.2 . Sélection des amorces

Plusieurs variables doivent être prises en considération lors de la conception des amorces pour la PCR. Les plus importantes sont :

- **La longueur de l'amorce**

Ce paramètre est essentiel pour le succès de la PCR. En général, les oligonucléotides entre 18 et 24 bases sont spécifiques de la séquence.

La longueur de l'amorce est également proportionnelle à l'efficacité de l'hybridation l'objectif est de concevoir une amorce dont la température d'hybridation est d'au moins 50 °C plus l'amorce est longue, moins l'hybridation est efficace.

- **Température de fusion (T_m)**

En général, une température de fusion de 55–72 °C donne les meilleurs résultats, elle correspond à une longueur d'amorce de 18–24 bases. Les deux amorces d'oligonucléotides doivent être conçues de sorte qu'elles aient des températures de fusion semblables.

- **Spécificité**

La spécificité de l'amorce dépend au moins partiellement de la longueur de l'amorce. Il est évident qu'il y a beaucoup plus d'oligonucléotides uniques à 24 paires de bases qu'à 15 paires de bases.

Les amorces doivent être choisies de telle sorte qu'elles aient une séquence unique dans l'ADN matrice qui doit être amplifié, une température de fusion de 55–72 °C donne les meilleurs résultats.

- **Séquences d'amorce complémentaire**

Les amorces doivent être conçues absolument sans aucune homologie intra-amorce au-delà de 3 paires de bases. Si une amorce possède une telle région d'auto-homologie, des structures partiellement doubles brin en « épingles à cheveux ».

Un autre risque connexe est l'homologie inter-amorce. L'homologie partielle dans les régions centrales de deux amorces peut interférer avec l'hybridation. Si l'homologie se situe à l'extrémité 3' de l'une ou de l'autre amorce, la formation de dimères d'amorce se produira, ce qui, par compétition, empêchera le plus souvent la formation du produit désiré.

- **Teneur en G/C et suites polypyrimidine (T, C) ou polypurine (A, G)**

La séquence d'amorce doit être choisie de telle sorte qu'il n'y ait aucune suite poly-G ou poly-C pouvant promouvoir une hybridation non spécifique.

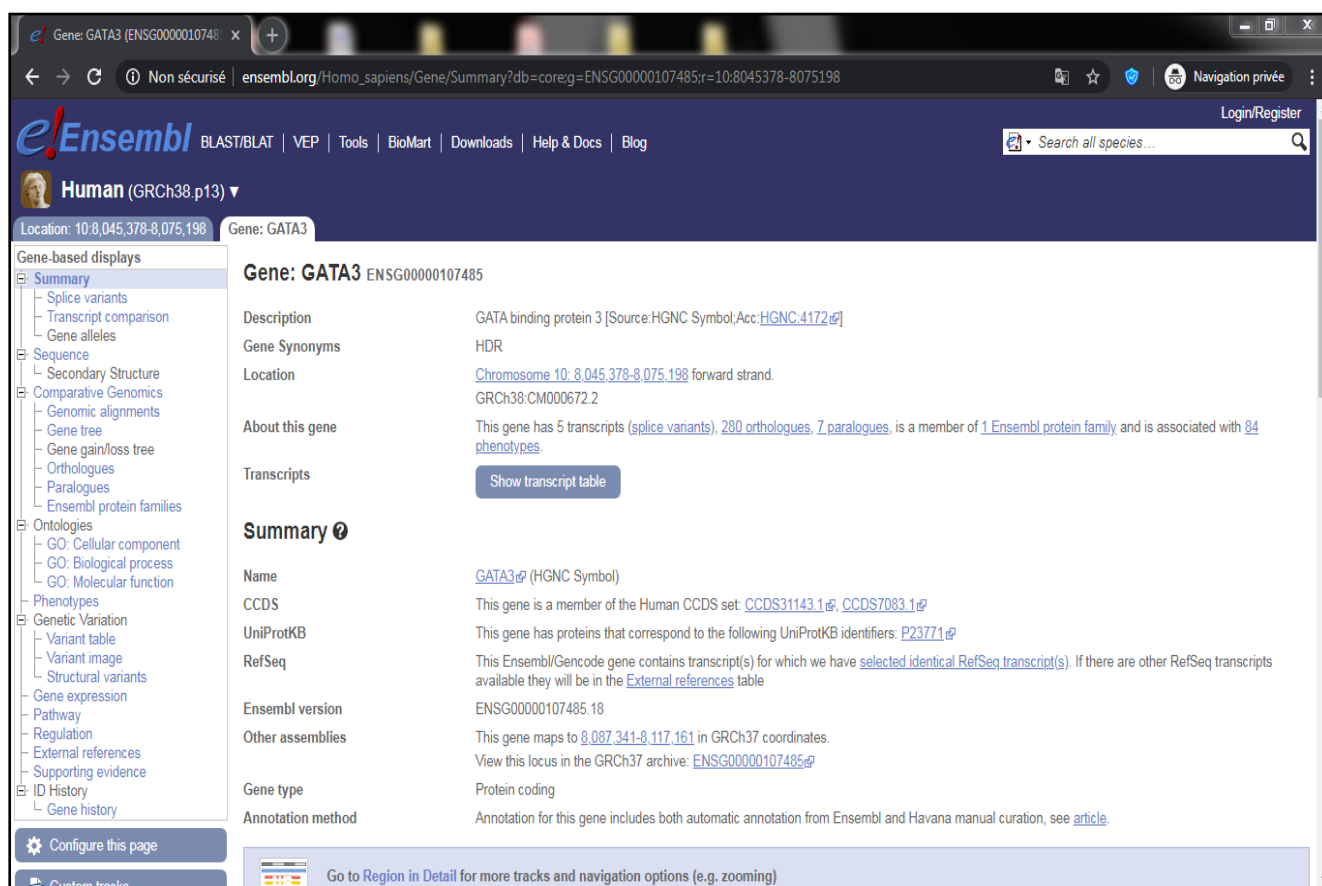
Les suites polypyrimidine (T, C) et polypurine (A, G) devraient également être évitées. Idéalement, l'amorce présentera un mélange presque aléatoire de nucléotides, une teneur de 50 % en GC et une longueur d'environ 20 bases (Elkins, 2015).

- **Séquence à l'extrémité 3'**

Il est établi que la position terminale 3' dans les amorces PCR est essentielle pour empêcher le désamorçage, Le problème des homologies d'amorce se produisant dans ces régions a déjà été reporté.

2.3 . Recherche de la séquence de référence du gène GATA3

La conception des amorces encadrant le gène GATA3 commence *par* la recherche de la séquence de référence du gène GATA3, pour cela la base de données « Ensembl » est utilisé grâce au site «www.ensembl.org», comme montré dans la Figure 2.1.



The screenshot shows the Ensembl genome browser interface for the gene GATA3. The browser address bar indicates the URL: ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000107485;r=10:8045378-8075198. The page title is "Gene: GATA3 (ENSG00000107485)". The main content area displays the following information:

- Gene: GATA3** ENSG00000107485
- Description:** GATA binding protein 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4172]
- Gene Synonyms:** HDR
- Location:** Chromosome 10: 8,045,378-8,075,198 forward strand. GRCh38:CM000672.2
- About this gene:** This gene has 5 transcripts ([splice variants](#)), [280 orthologues](#), [7 paralogues](#), is a member of [1 Ensembl protein family](#) and is associated with [84 phenotypes](#).
- Transcripts:** [Show transcript table](#)
- Summary:**
 - Name:** [GATA3](#) (HGNC Symbol)
 - CCDS:** This gene is a member of the Human CCDS set: [CCDS31143.1](#), [CCDS7083.1](#)
 - UniProtKB:** This gene has proteins that correspond to the following UniProtKB identifiers: [P23771](#)
 - RefSeq:** This Ensembl/Gencode gene contains transcript(s) for which we have [selected identical RefSeq transcript\(s\)](#). If there are other RefSeq transcripts available they will be in the [External references](#) table
 - Ensembl version:** ENSG00000107485.18
 - Other assemblies:** This gene maps to [8,087,341-8,117,161](#) in GRCh37 coordinates. View this locus in the GRCh37 archive: [ENSG00000107485](#)
 - Gene type:** Protein coding
 - Annotation method:** Annotation for this gene includes both automatic annotation from Ensembl and Havana manual curation, see [article](#).

Figure 2.1. Plateforme de la base de données Ensembl.

Figure 2.2. Séquence du gène *GATA3* par le site Ensembl.

Cette séquence est copiée dans un document Word, et la séquence d'intérêt est encadrée, comme montré dans la figure; pour faciliter notre recherche des amorces du gène *GATA3*.

Figure 2.3. La séquence de l'exon 1 du gène *GATA3*. Sont représenté en noir les séquences non codante, en rouge les exons.

2.4 . Le design des Primer

Dans les ressources du National Center for Biotechnology Information (NCBI) nous avons utilisé le logiciel Primer-BLAST dans le site « www.ncbi.nlm.nih.gov » afin de concevoir les amorces recherchées.

The screenshot displays the Primer-BLAST web interface. At the top, there are logos for NIH (U.S. National Library of Medicine) and NCBI (National Center for Biotechnology Information), along with a 'Sign in to NCBI' link. The main heading is 'Primer-BLAST' with the subtitle 'A tool for finding specific primers'. Below this, it states 'Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST)'. The interface is divided into three main sections: 1. 'PCR Template': Contains a text area for 'Enter accession, gi, or FASTA sequence' with a 'Clear' button. Below it is a 'Range' section with 'Forward primer' (From: 1, To: 226) and 'Reverse primer' (From: 420, To:) fields, each with a 'Clear' button. There is also an option to 'upload FASTA file' with a 'Choisir un fichier' button. 2. 'Primer Parameters': Includes fields for 'Use my own forward primer (5' -> 3' on plus strand)', 'Use my own reverse primer (5' -> 3' on minus strand)', 'PCR product size' (Min: 70, Max: 1000), '# of primers to return' (10), and 'Primer melting temperatures (Tm)' (Min: 57.0, Opt: 60.0, Max: 63.0, Max Tm difference: 3). 3. 'Exon/intron selection': Includes 'Exon junction span' (No preference), 'Exon junction match' (Min 5' match: 7, Min 3' match: 4, Max 3' match: 8), 'Intron inclusion' (checkbox: Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA), and 'Intron length range' (Min: 1000, Max: 1000000).

Figure 2.4. Outil Primer-BLAST.

2.5 . Analyse des Résultats du Primer-BLAST

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

- Choisir le couple d'amorces qui donne le moins de produits aspécifiques, afin d'amplifier que le produit étudié.
- Les températures d'hybridation des deux amorces doivent être les plus proches possibles, car la température d'hybridation lors d'une PCR est programmée en une seule température.
- La teneur en GC doit être proche de 40%.
- Ignorer les produits aspécifiques de plus de 1000 pb, car lors d'une PCR il est moins probable d'amplifier une séquence de plus de 1kb.

Chapitre 3. Résultats

3.1 . Résultats de la conception des amorces

L'utilisation de l'outil Primer-BLAST a permis d'obtenir trois couples d'amorces et les résultats sont représentés dans la (Figure 3.1).

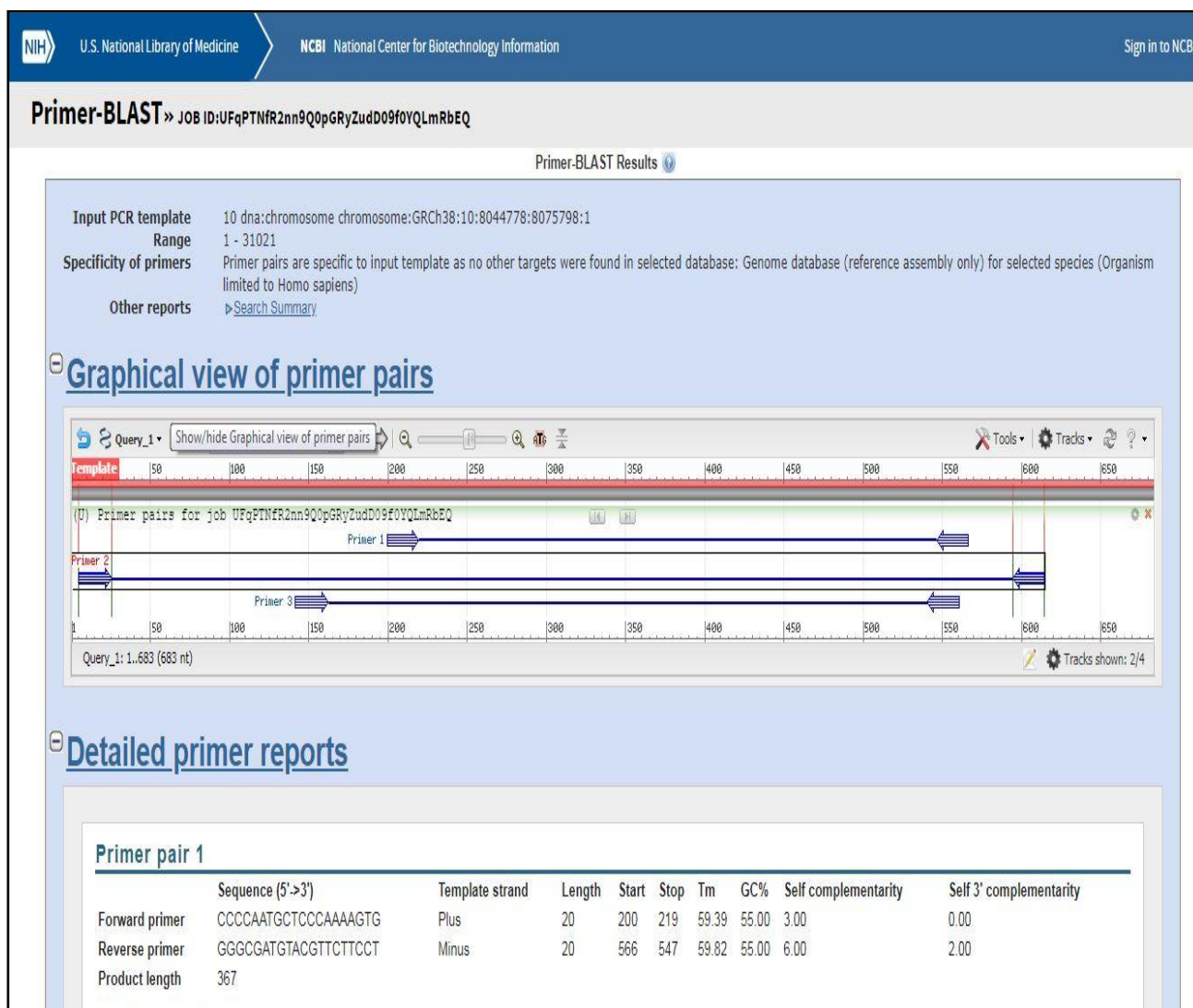


Figure 3.1. Résultats du Primer-BLAST.

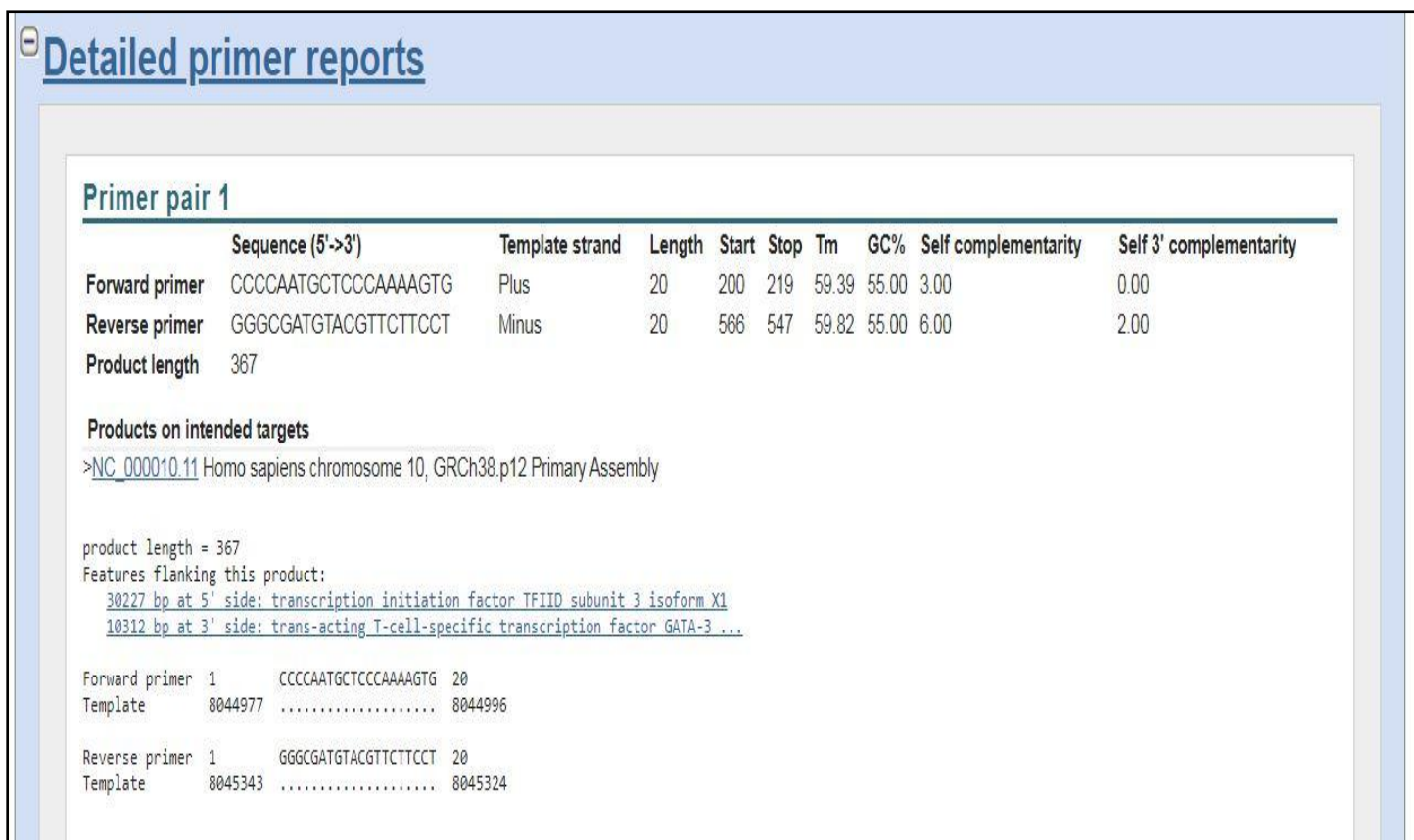


Figure 3.2. Amorce spécifique.

Chapitre 3. Résultats

Nous avons choisis la première paire d'amorces et sa pour les raisons suivante :

Cette paire d'amorces a été choisi car la réaction de polymérisation en chaine n'amplifie pas des produits au-delà de 3000 pb. En effet des produits de PCR de plus de 3000 pb pourraient être difficiles à amplifier, la concentration d'ADN devenant un facteur limitant.

En effet plus un produit de PCR est long plus sa concentration doit être élevée pour obtenir un résultat d'amplification satisfaisant (Lorenz, 2012).

La température d'hybridation des amorces est de 60°C, une température de 55 C -72 ° C donne les meilleurs résultats (à noter que cela correspond à une longueur de l'amorce de 18-24 bases).

La longueur des amorces est de 20 nucléotides (figure16). Les oligonucléotides entre 18 et 24 bases sont extrêmement spécifiques de la séquence, à condition que la température d'hybridation soit optimale. La longueur de l'amorce est également proportionnelle à l'efficacité de l'hybridation.

La longueur du produit est de 367pb. En général plus l'amorce est longue, moins l'hybridation est efficace.

La teneur en GC est de 55% pour l'amorce sens et anti sens. La teneur en GC d'une amorce doit être comprise entre 40 et 60%.

3.2 . Confirmations des résultats:

Nous avons soumis les séquences des amorces à une analyse de confirmation qui se fait par le site (<http://genome.ucsc.edu/>).

Les résultats de cette confirmation ont donné le produit situé sur le chromosome 10 (Figure 3.3).

Donc ces résultats nous confirment la fiabilité et la spécificité de l'amorce que nous avons conçue.

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, and Projects. Below this, the main heading is "UCSC In-Silico PCR". The results section shows a sequence for chromosome 10:8044977+8045343, 367bp. The sequence is: >chr10:8044977+8045343 367bp CCCCAATGCTCCCAAAAGTG GGGCGATGTACGTTCTTCTCT
CCCAATGCTCCCAAAAGTGgaaggaaaatgccatgcatgggtttatgcc
tatggtaatgacctagtcaacacttctgatgacatgtatagtgtaatcc
caacctgccagaagacagcgggctgtgcaggcggcggggccggtcaca
tttcaggccgcctttccccacccccgccagatctgtcagtttcacacacc
cctgatgtgcggtttgctgtttgcaaaagggggtgaattcattccctc
gctgtttctcctccctccctccctttccctcttcgcaaccggaagagc
tccgctctctacagtgagcaggagaaggcggaggaggaggggctcccAGG
AAGAACGTACATCGCCC

Below the sequence, there is a section titled "Primer Melting Temperatures". It lists the forward primer melting temperature as 64.8 C and the reverse primer melting temperature as 61.4 C. A note states: "The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration. The code to calculate the melting temp comes from [Primer3](#)."

Figure 3.3. Confirmation des Résultats par le site UCSC in silico PCR.

3.3 . Discussion

La conception des amorces est sans doute l'élément le plus important pour la réussite de la PCR. Toutes choses égales par ailleurs, une amorce mal conçue peut empêcher la progression de la réaction PCR (Ahrberg et *al.*, 2016).

La séquence d'amorce détermine plusieurs choses, telles que la position et la longueur du produit, sa température de fusion et finalement le rendement.

Une amorce mal conçue peut amener à une production faible, voire nulle, causée par une amplification non spécifique et/ou à la formation de dimères d'amorce, qui peuvent devenir suffisamment compétitifs pour inhiber la formation de produit (Elkins, 2015).

Notre comparaison de la liaison T-bet et GATA3 dans les cellules T humaines nous a permis de faire un certain nombre de nouvelles découvertes et de définir les principes généraux de la fonction T-bet et GATA3. Tout d'abord, T-bet et GATA3 s'associent avec des éléments distaux à travers le génome et ceux-ci sont concentrés dans un ensemble de gènes clés de régulation immunitaire. Deuxièmement, ces sites de liaison distaux ont les caractéristiques des éléments régulateurs et sont associés à la capacité du T-bet et du GATA3 à exercer des effets sur l'expression des gènes (Liao et *al.*, 2017).

Enfin, dans les cellules Th1, GATA3 est redistribué loin des sites distaux au niveau des gènes Th2 aux sites de liaison T-bet aux gènes Th1, et le T-bet est suffisant pour induire la liaison GATA3 à ces sites (Saravia et *al.*, 2019).

Dans les cellules Th2, GATA3 se lie à un ensemble unique de sites qui contiennent un motif GATA et qui sont associés à l'expression spécifique de Th2.

Chapitre 4. Conclusions et perspectives

La PCR est une méthode couramment utilisée pour amplifier l'ADN d'intérêt dans de nombreux domaines tels que la recherche biomédicale, les tests diagnostiques et les tests médico-légaux. Alors que le résultat de la PCR peut être influencé par de nombreuses autres conditions telles que la préparation de l'ADN matrice et les conditions de réaction, la conception d'une bonne paire d'amorces est un facteur critique.

C'est dans ce sens que nous avons jugé intéressant, de concevoir des amorces pour le gène *Gata3*, qui joue un rôle central dans la régulation de la différenciation des cellules Th2. surtout que, la régulation à la hausse de GATA3 a été rapportée chez les patients allergiques.

L'utilisation des outils de la bioinformatique tel que l'outil de conception d'amorce (Primer-BLAST) nous a permis d'établir des amorces PCR pouvant être utilisés aux protocoles expérimentaux dans les laboratoires de recherche et de diagnostic.

Enfin, la surexpression et le dysfonctionnement des facteurs de transcription conduisent à plusieurs maladies humaines, telles que le cancer et les maladies auto-immunes. Par conséquent, l'identification d'un facteur de transcription qui régule la différenciation cellulaire et le devenir par la régulation de l'expression génique pourrait être considérée comme une cible pharmacologique potentielle.

Chapitre 5. Bibliographie

A

Ahrberg, C.D., Manz, A., and Chung, B.G. (2016). Polymerase chain reaction in microfluidic devices. *Lab. Chip* 16, 3866–3884.

Amsen, D., Antov, A., Jankovic, D., Sher, A., Radtke, F., Souabni, A., Busslinger, M., McCright, B., Gridley, T., and Flavell, R.A. (2007). Direct regulation of Gata3 expression determines the T helper differentiation potential of Notch. *Immunity* 27, 89–99.

Annunziato, F., Cosmi, L., Liotta, F., Maggi, E., and Romagnani, S. (2015). Human T helper type 1 dichotomy: origin, phenotype and biological activities. *Immunology* 144, 343–351.

Asayama, K., Kobayashi, T., D'Alessandro- Gabazza, C.N., Toda, M., Yasuma, T., Fujimoto, H., Okano, T., Saiki, H., Takeshita, A., Fujiwara, K., et al. (2020). Protein S protects against allergic bronchial asthma by modulating Th1/Th2 balance. *Allergy* all.14261.

B

Bi, C., Sun, L., Qu, H., Chen, F., Tian, B., and Chen, F. (2019). The relationship between T- helper cell polarization and the RANKL/OPG ratio in gingival tissues from chronic periodontitis patients. *Clin. Exp. Dent. Res.* cre2.192.

von Boehmer, H. (2014). The Thymus in Immunity and in Malignancy. *Cancer Immunol. Res.* 2, 592–597.

C

Choufi, B., and Lassoued, K. (2012). The thymus in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Hématologie* 18, 272–282.

Cote-Sierra, J., Foucras, G., Guo, L., Chiodetti, L., Young, H.A., Hu-Li, J., Zhu, J., and Paul, W.E. (2004). Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3880–3885.

E

Elkins, K.M. (2015). Primer Design for PCR Reactions in Forensic Biology. In *PCR Primer Design*, C. Basu, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 17–30.

F

Fang, T.C., Yashiro-Ohtani, Y., Del Bianco, C., Knoblock, D.M., Blacklow, S.C., and Pear, W.S. (2007). Notch directly regulates Gata3 expression during T helper 2 cell differentiation. *Immunity* 27, 100–110.

Finkelman, F.D., Morris, S.C., Orekhova, T., Mori, M., Donaldson, D., Reiner, S.L., Reilly, N.L., Schopf, L., and Urban, J.F. (2000). Stat6 Regulation of In Vivo IL-4 Responses. *J. Immunol.* 164, 2303–2310.

G

Gibbons, H.R., Shaginurova, G., Kim, L.C., Chapman, N., Spurlock, C.F., and Aune, T.M. (2018). Divergent lncRNA GATA3-AS1 Regulates GATA3 Transcription in T-Helper 2 Cells. *Front. Immunol.* 9, 2512.

Glassman, C.R., Parrish, H.L., Lee, M.S., and Kuhns, M.S. (2018). Reciprocal TCR-CD3 and CD4 Engagement of a Nucleating pMHCII Stabilizes a Functional Receptor Macrocomplex. *Cell Rep.* 22, 1263–1275.

K

Kadri, K. (2020). Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. In *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*, M. L. Nagpal, O.-M. Boldura, C. Baltă, and S. Enany, eds. (IntechOpen), p.

Karn, R., and Isaac, A.E. (2019). Breast cancer mutation in GATA3 zinc finger 1 induces conformational changes leading to the closer binding of ZnFn2 with a wrapping architecture. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1–15.

Kisielow, P. (2019). How does the immune system learn to distinguish between good and evil? The first definitive studies of T cell central tolerance and positive selection. *Immunogenetics* 71, 513–518.

Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G., and Kyewski, B. (2009). Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 833–844.

Kohu, K., Ohmori, H., Wong, W.F., Onda, D., Wakoh, T., Kon, S., Yamashita, M., Nakayama, T., Kubo, M., and Satake, M. (2009). The Runx3 Transcription Factor Augments Th1 and Down-Modulates Th2 Phenotypes by Interacting with and Attenuating GATA3. *J. Immunol.* 183, 7817–7824.

Kunkl, M., Frasca, S., Amormino, C., Volpe, E., and Tuosto, L. (2020). T Helper Cells: The Modulators of Inflammation in Multiple Sclerosis. *Cells* 9, 482.

L

Laidlaw, B.J., Craft, J.E., and Kaech, S.M. (2016). The multifaceted role of CD4(+) T cells in CD8(+) T cell memory. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 102–111.

Lee, Y.-C. (2008). Synergistic effect of various regulatory factors in TH1/TH2 balance; immunotherapeutic approaches in asthma. *Int. J. Biomed. Sci. IJBS* 4, 8–13.

Liao, M.-H., Lin, P.-I., Ho, W.-P., Chan, W.P., Chen, T.-L., and Chen, R.-M. (2017). Participation of GATA-3 in regulation of bone healing through transcriptional upregulation of bcl-xL expression. *Exp. Mol. Med.* 49, e398.

Lorenz, T.C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *J. Vis. Exp.* 3998.

Luckheeram, R.V., Zhou, R., Verma, A.D., and Xia, B. (2012). CD4⁺T cells: differentiation and functions. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 925135.

N

Nakayamada, S., Takahashi, H., Kanno, Y., and O'Shea, J.J. (2012). Helper T cell diversity and plasticity. *Curr. Opin. Immunol.* *24*, 297–302.

Nomura, S., Takahashi, H., Suzuki, J., Kuwahara, M., Yamashita, M., and Sawasaki, T. (2019). Pyrrothiogatain acts as an inhibitor of GATA family proteins and inhibits Th2 cell differentiation in vitro. *Sci. Rep.* *9*, 17335.

O

Ohmura, S., Mizuno, S., Oishi, H., Ku, C.-J., Hermann, M., Hosoya, T., Takahashi, S., and Engel, J.D. (2016). Lineage-affiliated transcription factors bind the *Gata3* Tce1 enhancer to mediate lineage-specific programs. *J. Clin. Invest.* *126*, 865–878.

Onodera, A., Kokubo, K., and Nakayama, T. (2018). Epigenetic and Transcriptional Regulation in the Induction, Maintenance, Heterogeneity, and Recall-Response of Effector and Memory Th2 Cells. *Front. Immunol.* *9*, 2929.

P

van Panhuys, N., Tang, S.-C., Prout, M., Camberis, M., Scarlett, D., Roberts, J., Hu-Li, J., Paul, W.E., and Le Gros, G. (2008). In vivo studies fail to reveal a role for IL-4 or STAT6 signaling in Th2 lymphocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 12423–12428.

Patente, T.A., Pelgrom, L.R., and Everts, B. (2019). Dendritic cells are what they eat: how their metabolism shapes T helper cell polarization. *Curr. Opin. Immunol.* *58*, 16–23.

R

Rahman, M.T., Uddin, M.S., Sultana, R., Moue, A., and Setu, M. (2013). Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *Anwer Khan Mod. Med. Coll. J.* *4*, 30–36.

Rao, T.N., Kumar, S., Pulikkottil, A.J., Oliveri, F., Hendriks, R.W., Beckel, F., and Fehling, H.J. (2020). Novel, Non-Gene-Destructive Knock-In Reporter Mice Refute the Concept of Monoallelic *Gata3* Expression. *J. Immunol.* *ji2000025*.

Romano, O., and Miccio, A. (2020). GATA factor transcriptional activity: Insights from genome-wide binding profiles. *IUBMB Life* *72*, 10–26.

Rothenberg, E.V., Kueh, H.Y., Yui, M.A., and Zhang, J.A. (2016). Hematopoiesis and T-cell specification as a model developmental system. *Immunol. Rev.* *271*, 72–97.

Rushdi, M., Li, K., Yuan, Z., Travaglino, S., Grakoui, A., and Zhu, C. (2020). Mechanotransduction in T Cell Development, Differentiation and Function. *Cells* *9*, 364.

S

Sallusto, F. (2016). Heterogeneity of Human CD4⁺ T Cells Against Microbes. *Annu. Rev. Immunol.* *34*, 317–334.

Samson, S.I., Richard, O., Tavian, M., Ranson, T., Vosshenrich, C.A.J., Colucci, F., Buer, J., Grosveld, F., Godin, I., and Di Santo, J.P. (2003). GATA-3 Promotes Maturation, IFN- γ Production, and Liver-Specific Homing of NK Cells. *Immunity* *19*, 701–711.

Chapitre 5. Bibliographie

Saravia, J., Chapman, N.M., and Chi, H. (2019). Helper T cell differentiation. *Cell. Mol. Immunol.* *16*, 634–643.

Scheinman, E.J., and Avni, O. (2009). Transcriptional Regulation of *Gata3* in T Helper Cells by the Integrated Activities of Transcription Factors Downstream of the Interleukin-4 Receptor and T Cell Receptor. *J. Biol. Chem.* *284*, 3037–3048.

T

Takaku, M., Grimm, S.A., and Wade, P.A. (2015). GATA3 in Breast Cancer: Tumor Suppressor or Oncogene? *Gene Expr.* *16*, 163–168.

Takaku, M., Grimm, S.A., Roberts, J.D., Chrysovergis, K., Bennett, B.D., Myers, P., Perera, L., Tucker, C.J., Perou, C.M., and Wade, P.A. (2018). GATA3 zinc finger 2 mutations reprogram the breast cancer transcriptional network. *Nat. Commun.* *9*, 1059.

W

Van de Walle, I., Dolens, A.-C., Durinck, K., De Mulder, K., Van Loocke, W., Damle, S., Waegemans, E., De Medts, J., Velghe, I., De Smedt, M., et al. (2016). GATA3 induces human T-cell commitment by restraining Notch activity and repressing NK-cell fate. *Nat. Commun.* *7*, 11171.

Wang, H.-X., Pan, W., Zheng, L., Zhong, X.-P., Tan, L., Liang, Z., He, J., Feng, P., Zhao, Y., and Qiu, Y.-R. (2019). Thymic Epithelial Cells Contribute to Thymopoiesis and T Cell Development. *Front. Immunol.* *10*, 3099.

Y

Yamane, H., Zhu, J., and Paul, W.E. (2005). Independent roles for IL-2 and GATA-3 in stimulating naive CD4⁺ T cells to generate a Th2-inducing cytokine environment. *J. Exp. Med.* *202*, 793–804.

Yang, H., Zhang, H., Luan, Y., Liu, T., Roberts, K.G., Qian, M., Zhang, B., Yang, W., Perez-Andreu, V., Xu, J., et al. (2020). Non-coding germline *GATA3* variants alter chromatin topology and contribute to pathogenesis of acute lymphoblastic leukemia (*Cancer Biology*).

Z

Zhu, J. (2015). T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production. *Cytokine* *75*, 14–24.

Zhu, J. (2018). T Helper Cell Differentiation, Heterogeneity, and Plasticity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *10*.

Zhu, J., and Paul, W.E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* *112*, 1557–1569.

Zhu, J., and Paul, W.E. (2010). Peripheral CD4⁺ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol. Rev.* *238*, 247–262.

Zhu, J., Yamane, H., and Paul, W.E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu. Rev. Immunol.* *28*, 445–489.

Résumé

Introduction : Les cellules Th2 sont cruciales dans les réponses immunitaires adaptatives aux infections dues aux parasites extracellulaires tels que les helminthes. Les Th2 sont également responsables du développement de certaines maladies inflammatoires asthmatiques et allergiques. Le GATA-3 est le facteur de transcription clé régulant la différenciation et le maintien de la production de cytokines Th2.

Objectif : L'élaboration des séquences d'oligonucléotides qui serviront d'amorces à l'amplification du gène *GATA3* par PCR.

Matériel et méthodes : Nous avons réalisé une étude bio-informatique pour obtenir une amorce spécifique au gène *GATA3*. Pour cela on a cherché la séquence spécifique au gène *GATA3* à l'aide de la base de données www.ensembl.org, puis on a utilisé l'outil Primer-BLAST fournie par NCBI pour concevoir l'amorce. Enfin, on a confirmé les résultats par une PCR *in silico*.

Résultats : L'utilisation de l'outil Primer-BLAST a permis d'obtenir une amorce spécifique au gène *GATA3* à savoir : F primer CCCCAATGCTCCCAAAGTC, R primer GGGCGATGTACGTTCTTCCT avec un produit spécifique de 367 pb, Tm (F primer : 59,39 °C, R primer : 59,82 °C), la teneur en GC est de 55 % pour l'amorce sens et anti sens et une longueur de 20 nucléotides pour les deux amorces.

Conclusions : L'utilisation des outils de la bioinformatique, tel que l'outil de conception d'amorces (Primer-Blast), nous a permis d'établir des amorces PCR pouvant être utilisés aux protocoles expérimentaux dans les laboratoires de recherche et de diagnostic.

Mots clé : gène *GATA-3*, Th2, conception d'amorces, Primer-BLAST.

Abstract

Introduction: Th2 cells are crucial in adaptive immune responses to infections due to extracellular parasites such as helminths. Th2 is also responsible for the development of certain inflammatory asthmatic and allergic diseases. GATA-3 is the key transcription factor regulating the differentiation and maintenance of Th2 cytokine production.

Objective: The development of the oligonucleotide sequences that will serve as primers for the amplification of the *GATA3* gene by PCR.

Material and methods: We carried out a bioinformatics study to obtain a primer specific to the *GATA3* gene. For this we searched for the specific sequence of the *GATA3* gene using the database www.ensembl.org, then we used the Primer-BLAST tool provided by NCBI to design the primer. Finally, the results were confirmed by *in silico* PCR.

Results: The use of the Primer-BLAST tool made it possible to obtain a primer specific to the *GATA3* gene, namely: F primer CCCCAATGCTCCCAAAGTC, R primer GGGCGATGTACGTTCTTCCT with a specific product of 367 bp, Tm (F primer: 59.39 °C, R primer: 59.82 °C), the GC content is 55% for the forward and reverse primer and a length of 20 nucleotides for the two primers.

Conclusions: The use of bioinformatics tools, such as the primer design tool (Primer-Blast), allowed us to establish PCR primers that can be used in experimental protocols in research and diagnostic laboratories.

Keywords: *GATA-3* gene, Th2, primer design, Primer-BLAST.

ملخص

مقدمة : تعتبر خلايا Th2 حاسمة في الاستجابات المناعية التكيفية للعدوى بسبب الطفيليات خارج الخلية مثل الديدان الطفيلية. Th2 مسؤول أيضًا عن تطور بعض أمراض الحساسية والربو الالتهابية. *GATA-3* هو عامل النسخ الرئيسي الذي ينظم تمايز وصيانة إنتاج السيتوكين Th2.

الهدف : تطوير تسلسل قليل النوكليوتيد الذي سيكون بمثابة بادئات لتضخيم جين *GATA3* بواسطة PCR.

المواد والطرق: قمنا بدراسة المعلوماتية الحيوية للحصول على أساس خاص بجين *GATA3*. للقيام بذلك، بحثنا عن التسلسل الخاص بجين *GATA3* باستخدام قاعدة البيانات www.ensembl.org، ثم استخدمنا أداة Primer-BLAST التي يوفرها NCBI لتصميم التمهيدي. أخيرًا، تم تأكيد النتائج بواسطة *in silico* PCR.

النتائج: أتاح استخدام أداة Primer-BLAST من الممكن الحصول محددة التمهيدي لهذا الجين *GATA3*، وهو: F primer CCCCAATGCTCCCAAAGTC, R primer GGGCGATGTACGTTCTTCCT

Tm (F primer: 59.39 °C, R primer: 59.82 °C), محتوى GC هو 55٪ للطلاء التمهيدي الأمامي والخلفي وطول 20 نوكليوتيدات لكلا البادئين.

الاستنتاجات: استخدام أدوات المعلوماتية الحيوية، مثل أداة التصميم التمهيدي (Primer-Blast)، سمح لنا بإنشاء بادئات PCR يمكن استخدامها في البروتوكولات التجريبية في مختبرات البحث والتشخيص.

الكلمات المفتاحية : جين *GATA-3*, Th2, تصميم البادئات برايمر بلاست