

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة أبو بكر بلقايد – تلمسان
Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEM
كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون
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 Immunologie



MÉMOIRE

Présenté par

BELGACEM Abir

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Immunologie

Thème

Conception des amorces pour le gène *RORC* exprimé par les cellules lymphoïdes innées de types 3 (ILC3s) au cours des infections Fongiques

Soutenu le 19 juin 2022, devant le jury composé de :

Président	HADJ MERABET Djahida	MCB	Université de Tlemcen
Encadrant	NOUARI Wafa	MCB	Université de Tlemcen
Examineur	MILIANI Maroua	MCB	Université de Tlemcen

Année universitaire 2021/2022

Résumé

Résumé

Introduction : Les cellules lymphoïdes innées (ILCs) sont des populations cellulaires récemment identifiées. Ces cellules impliquées dans l'immunité innée sont caractérisées par une morphologie lymphoïde, et une expression de plusieurs facteurs de transcription et une production d'une variété cytokines. Les ILCs sont divisées en trois groupes ILC1, ILC2 et ILC3. Ce dernier groupe exprime le facteur de transcription ROR γ t qui est le régulateur transcriptionnel clé de son développement et de sa multifonctionnalité. Il se caractérise également par sa capacité à produire l'IL-17 et l'IL-22 intervenant dans l'élimination des infections fongiques et le maintien de l'homéostasie.

Objectif: concevoir une paire d'amorces encadrant le gène *RORC* exprimé par ILC3 afin d'étudier son implication dans l'élimination des infections fongiques.

Matériel et méthodes: La séquence du gène *RORC* a été obtenue à partir de la base de données "Ensembl". Ensuite, les amorces ont été conçues par l'outil de "Primer-BLAST".

Résultats: Parmi les 10 paires d'amorces spécifiques du gène *RORC* obtenues, nous avons sélectionné la 4^{ème} paires d'amorces car elle répond à tous les critères des bonnes amorces.

Conclusion : Des amorces bien conçues contribuent au succès de la réaction PCR pour amplifier correctement le gène *RORC* et étudier son expression par les ILC3 lors des infections fongiques.

Mots clés : Amorces, Gène *RORC*, ILC3, Infections fongiques, PCR.

Abstract

Abstract

Introduction: Innate lymphoid cells (ILCs) are recently identified cell populations. These cells involved in innate immunity are characterized by lymphoid morphology, and expression of several transcription factors and production of a variety of cytokines. ILCs are divided into three groups ILC1, ILC2, and ILC3. The latter group expresses the transcription factor ROR γ t which is the key transcriptional regulator of its development and multifunctionality. It is also characterized by its ability to produce IL-17 and IL-22 involved in the elimination of fungal infections and the maintenance of homeostasis.

Objective: To design a primer pair flanking the *RORC* gene expressed by ILC3 to study its involvement in the clearance of fungal infections.

Materials and methods: The *RORC* gene sequence was obtained from the "Ensembl" database. Then, the primers were designed by the "Primer-BLAST" tool.

Results: Among the 10 *RORC* gene-specific primer pairs obtained, we selected the 4th primer pair because it met all the criteria for good primers.

Conclusion: Well-designed primers contribute to the success of the PCR reaction to correctly amplify the *RORC* gene and study its expression by ILC3 during fungal infections.

Keywords: Fungal infections, ILC3, PCR, Primers, *RORC* gene.

مقدمة: مؤخرًا تم تحديد مجموعات الخلايا للمفاوية الفطرية (ILC) ، تتميز هذه الخلايا بمشاركتها في المناعة الفطرية بالشكل اللمفاوي و التعبير عن العديد من عوامل النسخ و إنتاج مجموعة متنوعة من السيتوكينات. تنقسم هذه الخلايا إلى ثلاث مجموعات ILC1، ILC2 و ILC3. تعبر المجموعة الأخيرة عن عامل النسخ ROR γ t وهو منظم النسخ الأساسي لتطورها ووظائفها المتعددة . تتميز أيضا بقدرتها على إنتاج IL-17 و IL-22 اللذان يساهمان في القضاء على الالتهابات الفطرية و الحفاظ على التوازن.

الهدف: تصميم زوج من البادئات التي تحيط بالجين *RORC* المعبر عنه بواسطة الخلايا ILC3 من أجل دراسة مشاركته في القضاء على الإلتهابات الفطرية.

المواد و الأساليب : تم الحصول على تسلسل الجين *RORC* من قاعدة البيانات "Ensembl". بعد ذلك، تم تصميم البادئات بواسطة أداة "Primer-BLAST".

النتائج: من بين 10 أزواج من البادئات الخاصة بجين *RORC* التي تم الحصول عليها، اخترنا الزوج الرابع من البادئات لأنها تلبى جميع معايير البادئات الجيدة.

الخلاصة: تساهم البادئات المصممة جيدا في نجاح تفاعل البوليميراز التسلسلي لتضخيم جين *RORC* بشكل صحيح ودراسة تعبيره بواسطة الخلايا ILC3 أثناء العدوى الفطرية.

الكلمات المفتاحية: جين *RORC* ، *ROR γ t*، ILC3، العدوى الفطرية، PCR، البادئات.

Avant-propos

Avant-propos

Louange à ALLAH le tout puissant de m' avoir donné la force, le courage et la volonté pour pouvoir achever ce travail.

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et d'Immunologie à l' université de Tlemcen (BIOMOLIM), sous la direction du Professeur Mourad ARIBI qui m' a accueilli dans son laboratoire.

Mes vifs remerciements à mon encadrante Dr. Wafa NOUARI, maître de conférences de classe B au département de biologie-Université de Tlemcen, qui m' a honoré en acceptant de diriger ce travail. Je lui remercie pour sa patience, sa confiance et ces précieux conseils.

Je tiens à remercier les membres du jury d' avoir accepté d' examiner ce travail.

Je dédie ce travail à mes parents, mes frères, ma copine et mon enseignante du primaire.

Table des matières

Table des matières

Résumé	III
Abstract	IV
ملخص	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
1.1. Les cellules lymphoïdes innés	2
1.1.1. Généralités	2
1.1.2. Historique	2
1.1.3. Développement	3
1.1.4. Localisation et circulation des ILCs	5
1.1.5. Classification	7
1.1.5.1. ILC type 1	7
1.1.5.2. ILC type 2	8
1.1.5.3. ILC type 3	8
1.1.5.3.1. Cellules inductrices des tissus lymphoïdes (LTi)	9
1.1.5.3.2. ILC3	9
1.1.6. Plasticité	10
1.1.7. Fonctions des ILC	11
1.2. Récepteur Orphelin gamma t lié à la protéine RAR (RORyt)	13
1.2.1. Généralité	13
1.2.2. Gène de Récepteur Orphelin C lié à la protéine RAR (<i>RORC</i>)	13
1.2.3. Transcription des isoformes ROR	13
1.2.4. Profils d'expression du gène <i>RORC</i>	14
1.2.5. Récepteur nucléaire RORyt	14
1.2.6. Fonctions de RORyt	15
1.3. Infections fongiques	16
1.3.1. Immunité anti-fongique	16
1.3.1.2. Immunité anti-fongique médiée par l'interleukine 17 (IL-17)	16

Table des matières

1.3.1.3. Rôle de l'ILC3 dans la réponse anti-fongique	17
1.4. PCR	18
1.4.1. Définition	18
1.4.2. Principe	18
1.4.3. Etapes de PCR	19
1.4.4. Applications de la PCR	19
1.5. Conception des amorces	20
1.5.1. Critères de choix de bonnes amorces	20
1.6. Problématique et objectifs	21
1.6.1. Problématique	21
1.6.2. Objectif	21
1.6.3. But	21
Chapitre 2. Matériel et méthodes	22
2.1. Conception des amorces pour le gène <i>RORC</i>	22
2.1.1. Recherche de la séquence du gène <i>RORC</i>	22
2.1.2. Design des primers : outil Primer-Blast	24
2.1.3. Confirmation des résultats : <i>in-silico</i> PCR	26
Chapitre 3. Résultats	27
3.1. Résultats de la conception des amorces	27
3.1.1. Résultats du Primer-BLAST	27
3.1.2. Résultats de la confirmation par <i>In-silico</i> PCR	28
Chapitre 4. Conclusion et perspectives	29
Chapitre 5. Bibliographie	30

Liste des figures

Liste des figures

Figure 1.1. Chronologie: Découverte des lymphocytes	3
Figure 1.2. Développement des ILC	4
Figure 1.3. Modèle des ILC humains avec leurs clusters de différenciation pendant leur développement	5
Figure 1.4. Distribution des sous-ensembles ILC chez les humains et les souris	6
Figure 1.5. Caractéristique des ILC1	8
Figure 1.6. Caractéristique des ILC3	10
Figure 1.7. Fonctions des ILCs	12
Figure 1.8. Localisation chromosomique du gène <i>RORC</i>	13
Figure 1.9. Locus <i>Rorc/RORC</i> et utilisation alternative des promoteurs pour les différentes isoformes chez la souris et l'homme	14
Figure 1.10. Structure du ROR γ t murin	14
Figure 1.11. Fonctions de ROR γ t	15
Figure 1.12. Schéma des réponses immunitaires antifongiques médiées par l'IL-17 dans la peau	17
Figure 1.13. Principe de la PCR	18
Figure 2.1. Plateforme de la base de données Ensembl	22
Figure 2.2. Résultats de la recherche du gène <i>RORC</i>	22
Figure 2.3. Caractéristiques du gène <i>RORC</i>	23
Figure 2.4. La séquence du gène <i>RORC</i> de puis la plateforme < Ensembl >	23
Figure 2.5. La séquence d'intérêt	24
Figure 2.6. Plateforme de la base de données NCBI	24
Figure 2.7. L'outil Primer-Blast	25
Figure 2.8. L'outil Primer-Blast	25
Figure 2.9. Primer Pair Specificity Checking Parameters	26
Figure 2.10. La plateforme « UCSC genome browser »	26
Figure 3.1. Les amorces	27
Figure 3.2. Primer pair 4	27
Figure 3.3. Résultat du Primer-Blast	28
Figure 3.4. Les amorces encadrant la région d'intérêt	29
Figure 3.5. Résultats de la confirmation	29

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Caractéristiques des sous-populations des ILC1

7

Liste des abréviations

Liste des abréviations

A

AA : Acide aminé

ADN : Acide désoxy ribonucléique

AF : Hélice de la fonction d'activation

Ahr : Récepteur d'aryl hydrocarbure

AG : Antigène

AREG : amphiréguline

B

Bcl-xL : B-cell lymphoma-extra large

C

C : Cytosine

C° : Celsius

CCR6 : Récepteur de chimiokine 6

CD : Cluster de différenciation

CHILP : Common helper innate lymphoid progénitor

CILP : Progéniteur lymphoïde inné Communs

CLP : Progéniteur lymphoïde communs

CNK : NK conventionnelles

CRTH2 : Récepteur 2 de la prostaglandine D2

CSH : Les cellules souches hématopoïétiques

C-Kit : Receptor tyrosine-protein

D

DBD : Domaine de liaison à l'ADN

DN : Double négatif

DP : Double positif

E

EOMES : Eomesodermin

Liste des abréviations

F

FasL : Ligand du récepteur Fas

G

G : Guanine

GATA : GATA binding protein 3

GM-CSF : Facteur de stimulation des colonies de granulocytes et macrophages

I

Id2 : Protéine de liaison d'ADN2

IFN : Interféron

IL : Interleukine

ILC : Innate lymphoid cells

iILC : ILC inflammatoire

ILCp : Cellule précurseurs des ILC

K

Kb : Kilobase

KIR : Récepteurs aux immunoglobulines

L

LBD : Ligand Binding Domain

Lin : Lineage

LTi : Lymphoid tissue inducer cell

LTip : Lymphoid tissue inducer progenitor

Ly49 : Récepteur membranaire de type Lectine-Like

LT $\alpha\beta$: Complexe membranaire

LT β R : Lymphotoxin beta receptor

N

NCR : Récepteur Natural cytotoxicité

nILC : Natural ILC cell

NK : Natural Killer

Liste des abréviations

NKp : Precursor of Natural Killer cell

NKp46 : Récepteur activateur

NR : Récepteur nucléaire

P

PCR : *Polymerase chain reaction*

PP : Plaques de Peyer

R

RA : Acide rétinoïque

RAG : Recombination Activating Gene

ROR : Retinoic acid-related Orphan receptor

S

SP : Sang périphérique

T

T-bet : Facteur de transcription T-box

TCF : T cell factor

Th : Cellule T helper

TLR : Toll like receptor

Tm : Température

TSLP : Lympho poïétine stromale thymique

TSS : Site de début de transcription

Introduction

Introduction

Les surfaces barrières sont constamment attaquées par des pathogènes potentiellement dangereux. Ces surfaces constituées de tissus muqueux contiennent un nombre important de lymphocytes innés, appelés cellules lymphoïdes innées (ILC) (Diefenbach, 2013). Ces cellules représentent un groupe hétérogène de cellules qui dérivent de progéniteurs lymphoïdes communs dans la moelle osseuse (Chiossone et al., 2018). Sur la base de la nature des cytokines produites et les facteurs de transcription exprimés, les ILCs se divisent en trois différentes populations effectrices : ILC1, ILC2 et ILC3 (Killig et al., 2014; Artis and Spits, 2015).

Les ILC3s jouent un rôle essentiel dans l'organogenèse lymphoïde et le maintien de l'homéostasie tissulaire dans des conditions stables et pathogéniques (Jarade et al., 2021). Ils combattent les microbes extracellulaires, comme les bactéries et les champignons par la sécrétion de l'interleukine 17 (IL-17), l'IL-22, lymphotoxine et le facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF) (Vivier et al., 2018). Il existe deux sous-ensembles d'ILC3 basé sur l'expression différentielle des marqueurs de surface cellulaire, le récepteur de chimiokine 6 (CCR6) et le récepteur de cytotoxicité naturelle (NCR): les cellules inducteurs du tissu lymphoïde (LTi) et ILC3 (Zheng and Zhu, 2022).

Récepteur Orphelin gamma lié à la protéine RAR (ROR γ t) est un facteur de transcription codée par le gène *RORC* (Feng et al., 2015). Ce facteur permet la régulation d'une variété de processus immunologiques (Matsumoto et al., 2013), notamment le développement des ganglions lymphatiques et des plaques de Peyer, et aussi la génération de cellules LTi (Eberl and Littman, 2003), et ILC3 (Cella and Romagnani, 2019).

Le système immunitaire inné joue un rôle central dans la résistance aux infections par des champignons, microorganismes omniprésents dans l'environnement, qui infectent l'homme suite à une exposition à des spores ou de petites cellules de levure (Romani, 2011 ; Brown and Wilson, 2019). Les cellules ILC3 sécrétant l'IL-17 qui est apparue comme un mécanisme de défense crucial (Gladiator et al., 2013).

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une méthode *in vitro* de synthèse d'acides nucléiques par laquelle un segment particulier d'ADN peut être répliqué spécifiquement (Mutlu, 2012). Cette technique est l'une des techniques essentielles de la biologie moléculaire et est actuellement utilisée dans le diagnostic des maladies en laboratoire (Abubakar et al., 2012).

Dans cet ordre d'idée, la présente étude a pour objectif de concevoir des amorces du gène ROR γ t exprimé par ILC lors des infections fongiques.

Chapitre 1. Revue de la littérature

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.1 Les cellules lymphoïdes innées

1.1.1 Généralités

Les cellules lymphoïdes innées (ILC, *innate lymphoid cells*) est le terme donné au groupe de cellules hématopoïétiques avec une morphologie lymphoïde (Teunissen et al., 2014) et mononucléaire (Hazenberg and Spits, 2014a). Il s'agit des cellules lymphoïdes qui n'expriment pas des récepteurs de l'antigène issu de réarrangement génique (Crinier et al., 2017a). Ces cellules sécrètent une grande variété de cytokines et sont impliquées dans l'immunité innée, inflammation, la formation du tissu lymphoïde et le remodelage des tissus. Conformément à leur rôle dans la surveillance immunitaire et leur implication dans la détection précoce de pathogènes, les ILC sont localisés sur les surfaces muqueuses et répondent aux molécules sécrétées par l'épithélium (Constantinides et al., 2014a).

En fonction de leurs spécificités, des différents types des cytokines synthétisées et de l'expression de facteurs de transcription particuliers pour leur développement et de leur fonctionnement, les ILC sont classées en trois groupes : ILC1s, ILC2s et ILC3s (Hazenberg and Spits, 2014b).

1.1.2 Historique

La découverte des ILCs est récente par rapport à toutes les recherches sur les leucocytes menées par Andral et Addison depuis 1843. Ce n'est qu'en 1975 que Kiessling, Herberman et leurs collaborateurs mettent en évidence les premiers lymphocytes innés : les cellules tueuses naturelles (NK). Par la suite, en 1997, Mebius et ses collaborateurs ont mis en évidence l'existence d'une seconde population lymphocytaire innée, les lymphoid tissue inducer cells (LTi). Les cellules NK et les LTi sont restées les seuls types connus de lymphocytes innés jusqu'à ce qu'une dizaine d'équipes révèlent simultanément l'existence de toute une partie immunologique inconnue (Crinier et al., 2017b). Une série d'articles publiés entre 2008 et 2011 ont bien montré l'existence de nouveaux lymphocytes innés, appelés NK22, Retinoic acid (RA)-related orphan receptor γ isoform *t* (ROR γ t)⁺NK46⁺, NK-LTi, des cellules nucléaires ou encore des cellules auxiliaires naturelles (Cella et al., 2009a) (Vonarbourg et al., 2010a). Rapidement, en croissant leurs propriétés, ces cellules nouvellement découvertes ont été classées en trois catégories : les ILC de type 1 (dont les cellules NK), les ILC de type 2 et les ILC de type 3 (dont les cellules LTi) (Spits et al., 2013). La figure 1.1 représente les découvertes des lymphocytes durant la période entre 1959 et 2008.

Chapitre 1. Revue de la littérature

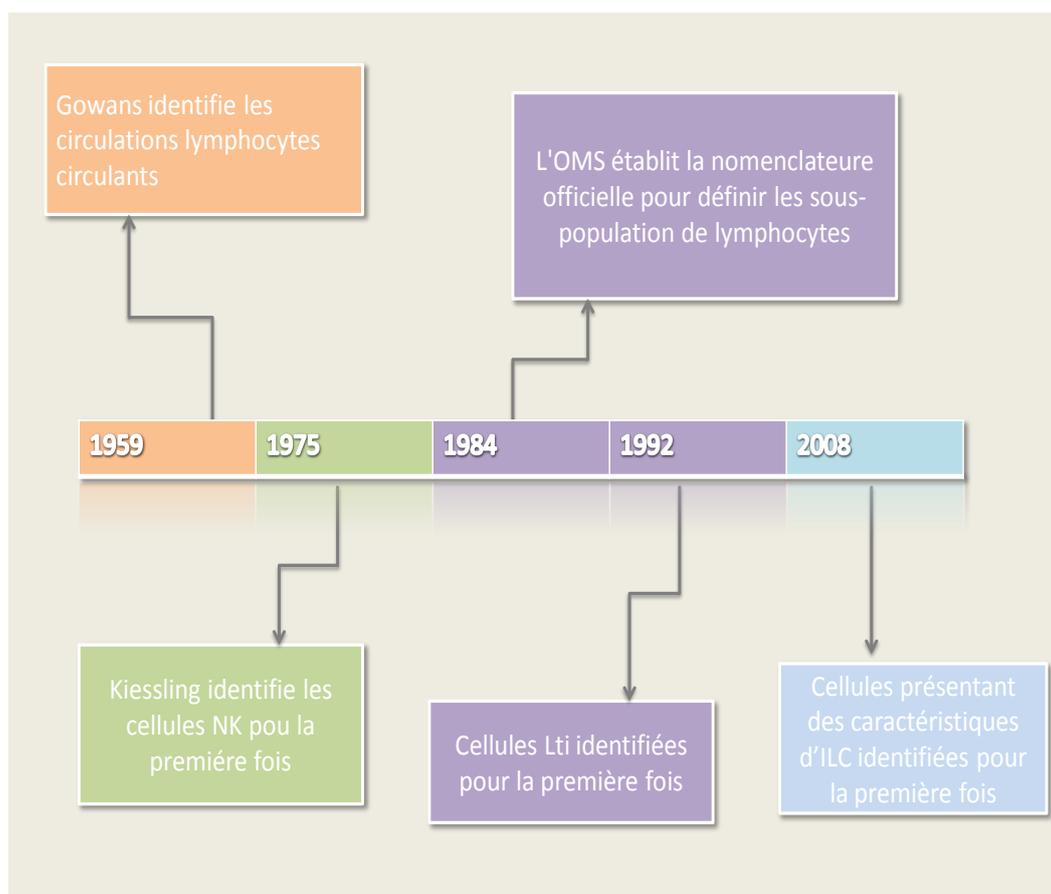


Figure 1.1. Chronologie: Découverte des lymphocytes (Ruiz-Sánchez et al., 2017). Les premières descriptions des cellules lymphoïdes innées (ILC) ont été publiées en 2008, les cellules NK Et les cellules inductrices du tissu lymphoïde (LTi), qui appartiennent également à la famille des lymphocytes innés ont été décrites plusieurs années auparavant.

1.1.3. Développement

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont des cellules pluripotentes et auto-renouvelables fournissant le substrat cellulaire pour la génération de toutes les lignées hématopoïétiques, y compris les cellules érythroïdes, mégacaryocytoïdes, myéloïdes et lymphoïdes). Ces cellules souches donnent naissance à deux type de progéniteurs : progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) et progéniteurs myéloïdes commun (Serafini et al., 2015). CLP donnent la naissance à des progéniteurs lymphoïdes innés communs (CILP) (van de Pavert and Vivier, 2016) définies comme $Lin^- CD34^+ CD45RA^+ CD10^- CD117^+ CD94^- IL-1R1^+ ROR\gamma t$ (Rethacker, 2021). Ce dernier n'a pas la capacité de générer les cellules T et B. Les ILCs se développent à partir des progéniteurs lymphoïdes innés auxiliaires communs (CHILPs) (Cella and Romagnani, 2019). Ce dernier a le potentiel de donner naissance exclusivement aux cellules ILC1, ILC2, ILC3 et LTi, mais qui n'ont pas le de se différencier en cellules Natural killer (NK) (Kotas and Locksley, 2018). A partir des cellules (CHILPs), il ya un nouvel embranchement des cellules précurseurs des ILC (ILCp), définie

Chapitre 1. Revue de la littérature

comme $\text{Lin}^- \text{CD34}^- \text{CD7}^+ \text{CD127}^+ \text{CD117}^+$, qui génèrent toutes les populations d'ILC dans différentes conditions environnementales (Serafini et al., 2015) (figure 1.2 et 1.3).

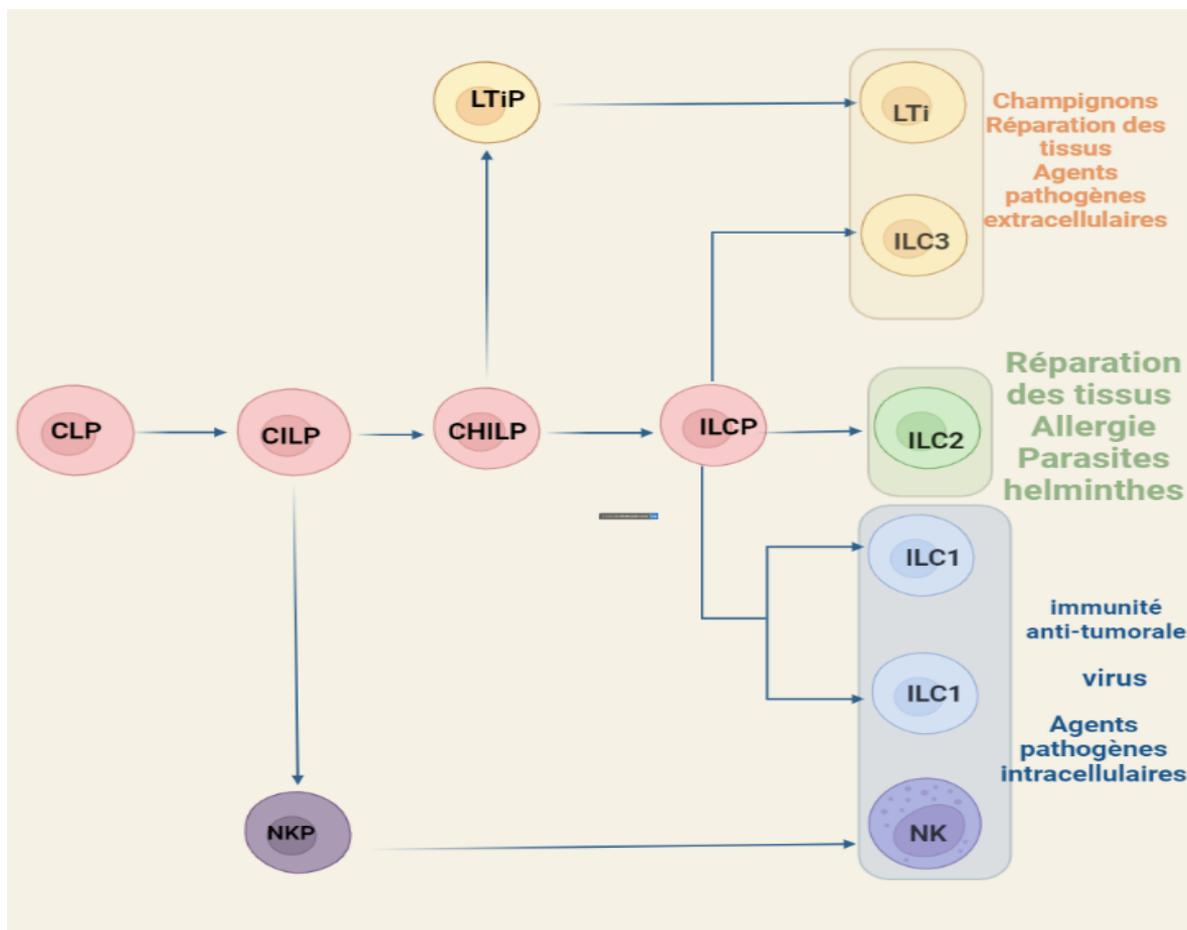


Figure 1.2. Développement des ILC (Crinier et al., 2017a). CHILP:common helper innate lymphoid progenitor, CILP:common innate lymphoid progenitor, CLP: common lymphoid progenitor, ILC:innate lymphoid cell,ILCP:innate lymphoid cell precursor,LTI:lymphoid tissue inducer cells,LTIp:lymphoid tissue inducer progenitor,NK :natural killer cells, NKP: precursors of natural killer cells.

Chapitre 1. Revue de la littérature

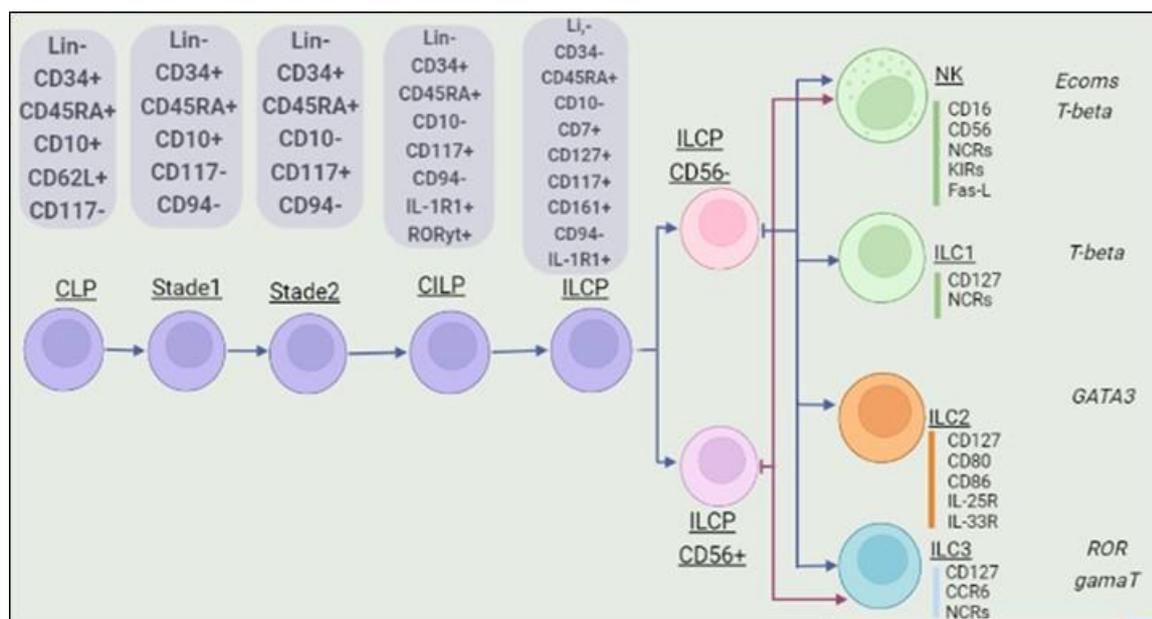


Figure 1.3. Modèle des ILC humains avec leurs clusters de différenciation pendant leur développement (Rethacker, 2021). **CD**: Classes de différenciation, **CILP**: Common innate lymphoid progenitor, **CLP** Common lymphoid progenitor, **FasL**: Ligand du récepteur Fas, **GATA**: GATA binding Protein3, **IL**: interleukine, **ILC**: Innate lymphoid cell, **ILCP**: innate lymphoid cell precursor, **KIR2**: Récepteurs aux immunoglobulines, **Lin**: Lineage, **NCR**: Récepteur Naturel Cytotoxicité, **NK** Natural killer, **ROR**: Récepteur Orphelin lié à la protéine RAR, **T-bet**: Facteur de transcription T-box.

1.1.4. Localisation et circulation des ILCs

Chez les individus en bonne santé, environ 0,01 à 0,1% des lymphocytes circulants expriment un phénotype CD127⁺ ILC (Mjösberg et al., 2011).

Après la naissance, les ILC ont été définies dans plusieurs tissus muqueux et non muqueux, y compris les poumons. Les cellules NK se localisent dans le sang périphérique (SP), le foie, les poumons et la rate (Cella et al., 2009b). Contrairement aux cellules NK, les ILC1 représentent une population mineure dans la plupart des organes humains et apparaissent surtout dans le tractus gastro-intestinal. Les ILC2 humaines constituent un sous-ensemble prédominant dans la peau et le SP. Ils représentent environ 40% de tous les ILC de la peau. Ils peuvent aussi être trouvés à des fréquences moindres dans les tissus adipeux, des groupes lymphoïdes associés à la graisse dans l'intestin et dans le SP (Bal et al., 2016). Enfin, les ILC3 sont fortement présentes dans les amygdales et la muqueuse du tractus gastro-intestinal où ils peuvent exercer leur action antimicrobienne (Stehle et al., 2018a).

Chez la souris, les cellules NK sont très abondantes dans la plupart des organes, tels que la rate, le foie et les poumons (Sojka et al., 2014). Les ILC1 murines sont également présentes dans la lamina propria la couche intra-intestinale, mais aussi au niveau du foie et des glandes salivaires. Tout comme chez l'homme, les ILC2 murines constituent le principal

Chapitre 1. Revue de la littérature

sous-ensemble d'ILC dans la peau. Les ILC3 murines dominant le tractus gastro-intestinal de façon parallèle à celui des humains (Stehle et al., 2018a). Bien que les facteurs de transcription et les cytokines effectrices restent cohérents dans le sous-ensemble ILC à travers les compartiments, le profil phénotypique entre les tissus peut changer (Dutton et al., 2017).

La stricte compartimentation tissulaire des ILC indique que les niches spécifiques aux tissus sont importantes pour le maintien et la différenciation des ILC. Des études ont montré que les ILC sont résidentes des tissus dans les organes lymphoïdes et non lymphoïdes (Constantinides et al., 2014b), ce qui suggère que ces cellules peuplent rapidement leurs niches et ne pas retourner dans la circulation ou migrer vers les autres organes dans des conditions stables (Stehle et al., 2018a). La figure 1.4 représente la localisation des sous-classes d'ILC dans différents organes chez l'homme et la souris.

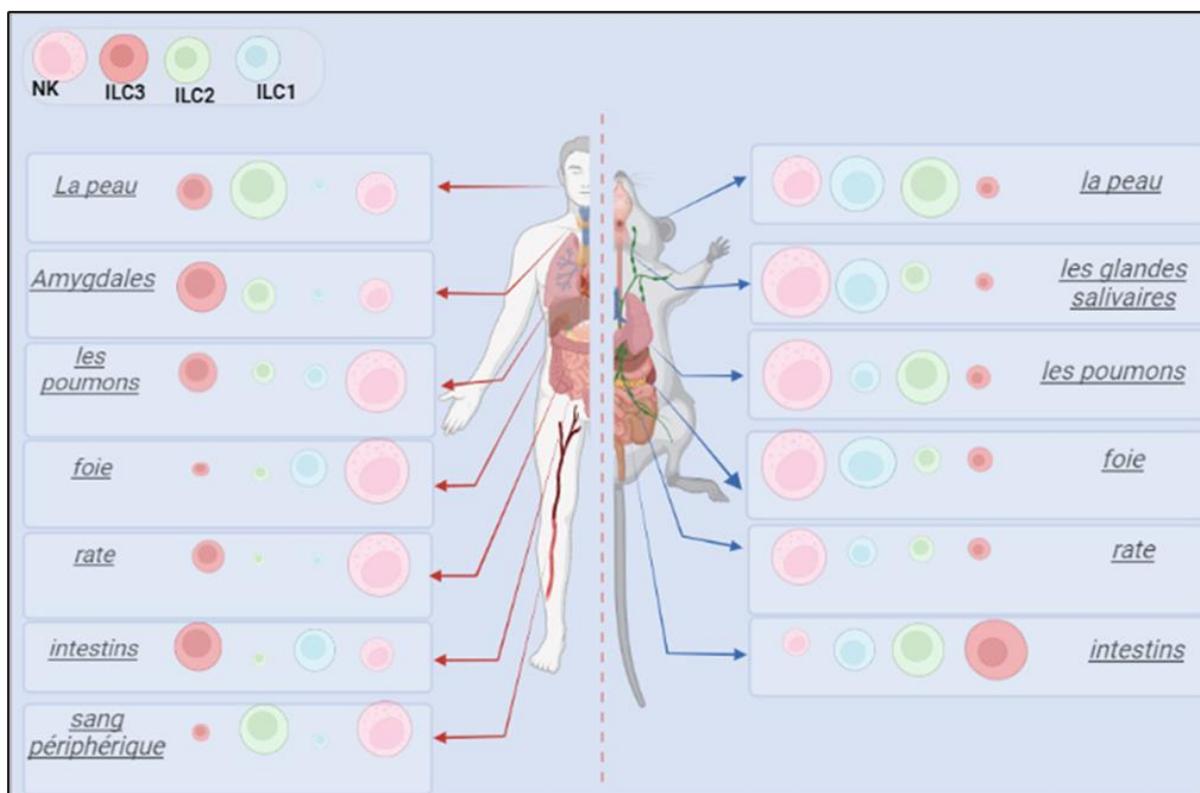


Figure 1.4. Distribution des sous-ensembles ILC chez les humains et les souris (Stehle et al., 2018a). ILC: Innate lymphoid cell, NK: Natural killer.

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.1.5. Classification

Bien que tous les sous-ensembles d'ILC auxiliaires soient présents dans les cellules épithéliales, il n'est pas facile d'avoir une vision complète de leur distribution et de leur fonction (Ciudad, 28Jun2018).

1.1.5.1 ILC de type1

Les ILC1 sont composés des cellules ILC1 Eomesodermin (EOMES⁺) NK conventionnelles (cNK) et des ILC de type 1 (ILC1 non-NK) (EOMES⁻). Fonctionnellement, ce type est défini comme des sous-ensembles de lymphocytes innés ayant la capacité de produire l'interféron-Gamma (IFN- γ) sous l'effet de l'IL-12 (Nabekura and Shibuya, 2021). Le tableau 1.1 et la figure 1.5) représentent les caractéristiques des sous-ensembles d'ILC1.

Tableau 1.1. Caractéristiques des sous-populations des ILC1 (Bresler, 2018)

ILC1 (cNK) Eomes ⁺	ILC1 non-NK Eomes ⁻
<ul style="list-style-type: none">• Sensibles à l'IL-15.• Dépendent de facteur de transcription T-box (T-bet) et EOMES pour leur développement.• Cytotoxiques (production de Perforine et de Granzymes).• Sécrètent de l'interféron gamma (IFNγ).• Expriment l'intégrine CD49b (DX5), et les récepteurs activateurs (NKp46) et inhibiteurs Ly49.• L'intégration des signaux activateurs et inhibiteurs aboutit soit à la cytolyse soit à la tolérance/ignorance.	<ul style="list-style-type: none">• Non cytotoxiques.• Dépendent de l'IL-7 de T-bet et de GATA3, mais pas d'EOMES.• Sécrètent de l'IFNγ.• Participent aux réponses immunitaires anti-infectieuses et anti-cancéreuses.

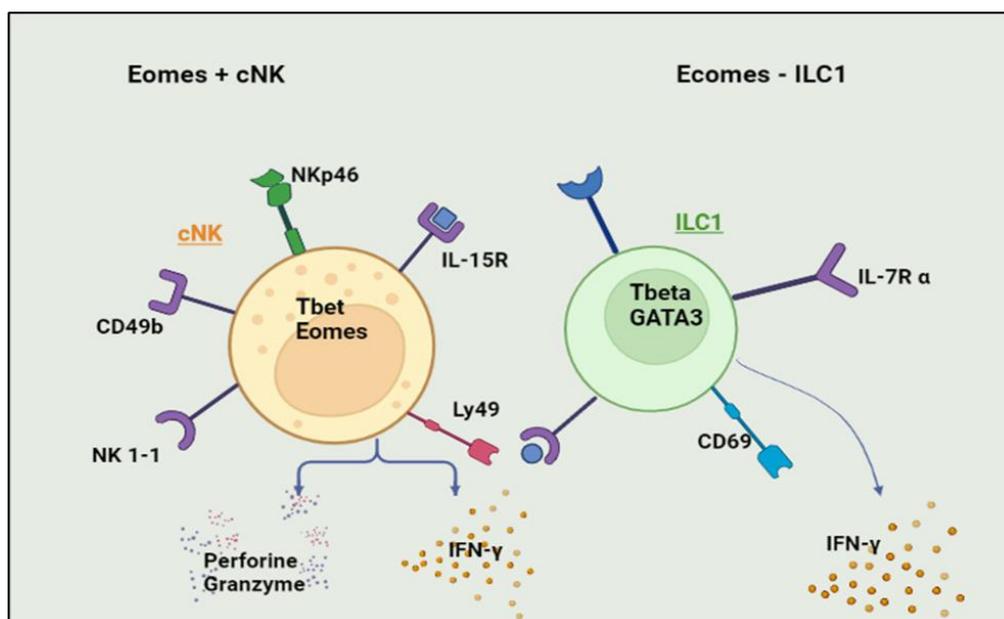


Figure 1.5. Caractéristique des ILC1 (Bresler, 2018). Représentation des marqueurs de surface, des facteurs de transcription et des cytokines exprimées par les ILC1 EOMES⁺(cNK) et EOMES⁻ (ILC1 non-NK). **CD**: cluster de différenciation, **IFN**: interféron, **IL**: Interleukine, **ILC**: innate lymphoid cell, **Ly49**: Récepteur membranaire de type lectine-like, **NKP46**: récepteur activateur, **T-bet**: Facteur de transcription T-box.

1.1.5.2. ILC de type 2

La découverte des ILC2 a commencé en 2001 suite aux travaux de Fort et al, mettant en évidence le rôle de l'alarmine et l'IL-25 dans l'induction de la sécrétion de cytokines de type 2 telles que l'IL-13, l'IL-4 et l'IL-5 (Bresler, 2018). En réponse à l'IL-33 et l'IL-25, les ILC2 produisent aussi de l'amphiréguline (AREG) (Cording et al., 2016). Ces cellules expriment les facteurs de transcription GATA-binding protein 3 (GATA3) et récepteur orphelin lié à la protéine RARα (RORα) (Elemam et al., 2017). Par ailleurs, il a été montré que lors d'une infection chez la souris, les chercheurs distinguent deux groupes d'ILC2 : les ILC2 naturelles (natural ILC2-nILC2) et les ILC2 inflammatoires (inflammatory ILC2-iILC2) (Huang et al., 2015).

1.1.5.3 ILC de type 3

Les ILC3 sont dérivées de progéniteurs hépatiques fœtaux pendant l'embryogenèse et font partie des premiers lymphocytes àensemencer les tissus de la barrière, en particulier le tractus intestinal, avant même la naissance (Withers and Hepworth, 2017). Dans ce cadre, les ILC3 sont parmi les premières à répondre à la colonisation microbienne commensale ainsi qu'aux antigènes (AG) d'origine alimentaire introduits après le sevrage. De plus, ces cellules sont des organisateurs centraux de l'organogenèse lymphoïde secondaire (van de Pavert and Mebius, 2010).

Chapitre 1. Revue de la littérature

Les ILC3 sont définies par $\text{Lin}^- \text{CD127}^+ \text{CD117}^+$ et le récepteur 2 de la prostglandine D2 (CRTH2^-) (Cypowyj and Vivier, 2016). Elles diffèrent des autres groupes en ce qu'elles constituent au moins deux sous-ensembles authentiques: les cellules inductrices des tissus lymphoïdes (LTI) et les ILC3 qui sont distincts sur le plan transcriptionnel, développemental et fonctionnel (figure 1.6) (Withers and Hepworth, 2017).

1.1.5.3.1 Cellules inductrices des tissus lymphoïdes (LTI)

Les LTI sont des ILC3 qui ont été découvertes il y a presque deux décennies (Spits and Cupedo, 2012). Ces cellules représentent la population la plus nombreuse d'ILC3 au cours de la vie fœtale et sont localisées dans les ganglions lymphatiques (Bresler, 2018). Elles expriment le complexe membranaire $\text{LT}\alpha 1\beta 2$ qui est essentiel pour le développement des plaques de Peyer (PP), des ganglions lymphatiques, des follicules lymphoïdes isolés et des cryptopatches dans l'intestin *via* des interactions avec lymphotoxin beta receptor ($\text{LT}\beta\text{R}$) sur les cellules organisatrices du tissu lymphoïde (Korchagina et al., 2021a). de plus, il a été montré que les cellules LTI jouent un rôle dans la défense immunitaire contre l'infection durant la vie adulte par la production des cytokines pro-inflammatoires, y compris l'IL-17A et IL-22 qui sont impliqués dans la défense contre les pathogènes bactériens et fongiques (N et al., 2015), suite à une stimulation par l'IL-23, l'IL-1 β ou l'IL-6 (Charlotte VIANT et al., 2016). Les LTI obtiennent ces diverses fonctions grâce à l'expression du facteur de transcription $\text{ROR}\gamma\text{t}$, qui est nécessaire à leur génération (N et al., 2015) et elles se caractérisent par une forte expression de récepteur de chimiokine 6 (CCR6), CD127 , et une expression variée de CD4 et CD161 (Gronke et al., 2016).

Les cellules LTI fœtales murines sont définies comme étant de la lignée $(\text{Lin})^- \text{IL-7R}\alpha^+$ récepteur tyrosine-protein (C-kit) $^+ \text{ROR}\gamma\text{t} \alpha 4\beta 7^+$ et comprennent des cellules LTI CD4^+ et CD4^- . Les cellules LTI humaines identifiées dans les ganglions lymphatiques et la rate du fœtus présentent un phénotype similaire, mais sont dépourvues de CD4 et expriment CD7 et CD161 (Montaldo et al., 2015).

1.1.5.3.2. ILC3

Les ILC3 humaines et murines sont généralement localisées dans la lamina propria des différentes parties de l'intestin, ainsi que dans les amygdales humaines (Montaldo et al., 2014). Grâce à des facteurs de différenciation spécifiques (acide rétinoïque-AR, polyphénols et microbiote), les ILC3 deviennent matures (Domingues and Hepworth, 2020). La prolifération des ILC3 intestinaux est stimulée par les cytokines, notamment IL-18, la cytokine 1A similaire au facteur de nécrose tumorale, l'IL-1 β , l'IL-23 et l'IL-2, les acides gras libres à chaîne courte (AGCC) et les vitamines A et D. Les ILC3 sont présentes dans différents compartiments du GALT où elles interagissent étroitement avec d'autres cellules

Chapitre 1. Revue de la littérature

immunitaires, comme les cellules Th1 et Th17 (Miljković et al., 2021). Une fraction de ces ILC3 partage l'expression des récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR, *Natural Cytotoxicity Receptors*) (NKp46 chez la souris et NKp44 chez l'homme) avec les cellules NK (Montaldo et al., 2014). Les ILC3 sécrètent l'IL-22, le facteur GM-CSF et une petite quantité d'IL-17 (figure 1.6) (Jarade et al., 2021).

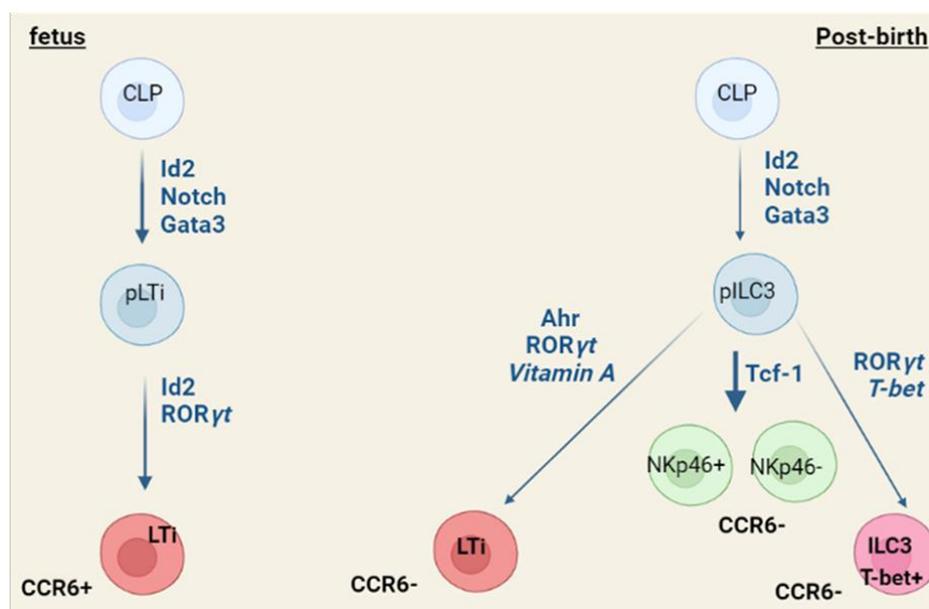


Figure 1.6. Caractéristiques des ILC3s (Cording et al., 2014). Chez le fœtus, (CLP) génèrent les cellules LTi. Le développement de toutes les ILC nécessite l'inhibiteur de la protéine de liaison d'ADN 2 (Id2) pour bloquer la génération des cellules B et T. Le développement d'ILC3 nécessite spécifiquement RORγt, tandis que Gata 3 est impliqué dans le développement d'ILC3 et ILC2. Après la naissance, les précurseurs des ILC3 génèrent un sous-ensemble supplémentaire d'ILC3 qui n'exprime pas récepteur de chimiokine 6 (CCR6) et n'induit pas la formation de tissu lymphoïde, y compris les cellules NK précurseur (NKP46+) dépendantes de Tcell factor-1 (TCF-1). De plus, les LTi et CCR6⁻ ILC3 deviennent dépendants du récepteur d'aryl hydrocarbure (Ahr) qui se lie aux métabolites alimentaires, et la Vitamine A. Dans le cas d'une inflammation, les ILC3 CCR6⁻ NKp46⁻ ou précurseurs ILC3 génèrent des cellules T-bet⁺. **Ahr**: Récepteur d'aryl hydrocarbure, **CCR**: récepteur de chimiokine, **CLP**: Common lymphoid progenitor, **GATA3**: GATA binding protein3, **Id2**: DNA-binding protein inhibitor, **ILC**: Innate lymphoid cell, **LTi**: Lymphoid tissue inducer cell, **NKP**: les cellules NK précurseur, **pILC3**: innate lymphoid cell 3 precursor, **pLTi**: lymphoid tissue inducer precursor, **T-bet**: Facteur de transcription T-box, **Tcf-1**: T cell factor1.

1.1.6 Plasticité

La plasticité des populations d'ILC est contrôlée par des cytokines et des facteurs de transcription différents (Korchagina et al., 2021b), à la fois chez la souris et l'homme et en particulier entre les ILC1 et les ILC3 (Juelke and Romagnani, 2016). Cette plasticité peut être intéressante dans les pathologies caractérisées par l'augmentation d'un sous-groupe par rapport à un autre (Schulz-Kuhnt et al., 2020).

La première étude mettant en évidence la plasticité d'ILC3 a été menée en 2010 par Vonarbourg et al (Vonarbourg et al., 2010b). Chez l'homme, la conversion des ILC3 vers des ILC1 est favorisée par l'IL-2, l'IL-12, l'IL-15 et l'inhibition de la signalisation AhR, tandis que l'IL-1, IL-23 et l'acide rétinoïque (RA) préservent le phénotype ILC3 (Juelke and Romagnani,

Chapitre 1. Revue de la littérature

2016). Par ailleurs, les ILC1 acquièrent le phénotype ILC3 en réponse à l'IL-2, l'IL-23, l'IL-1 β (Ciudad, 2018). Des études *in vivo* dans un modèle murin sur la maladie de Crohn indiquent que l'accumulation d'ILC1 dans la muqueuse intestinale est une conséquence de la transformation de l'ILC3 résidentes (Bernink et al., 2013).

Les ILC2 ont également la capacité de se différencier en ILC1. Plusieurs travaux ont indiqué que les ILC2 sanguins cultivés en présence de l'IL-12 avec ou sans IL-1 β produisent de l'IFN- γ . Pour passer au phénotype ILC1, les ILC2 baissent l'expression du GATA3, CD117 et récepteur 2 de la prostaglandine D2 (CRTH2) et augmentent l'expression du T-bet (Rethacker, 2021).

D'autre part, les ILC2 peuvent aussi obtenir certaines caractéristiques des ILC3. La culture des ILC2 murines en présence de l'IL-2 et l'IL-7 permet de générer une population d'ILC2 dites "inflammatoires" (iILC2) qui expriment le facteur ROR γ t (Charlotte VIANI et al., 2016) et se sont différenciées en cellules nommées (ILC3-like) capables de sécréter l'IL-17. Dans l'organisme, ces cellules peuvent jouer un rôle dans l'immunité anti-fongique et anti-parasitaire. Par ailleurs, l'ILC3 humaines, lors de la costimulation avec l'IL-2-TLR (*Toll like receptor*) 2, peuvent produire l'IL-13 et l'IL-5 *in vitro*, qui sont des cytokines spécifiques des ILC2 (Crinier et al., 2017b).

1.1.7. Fonctions des ILC

Les ILC semblent jouer un rôle dans la première ligne de défense contre les agents pathogènes (Peters et al., 2016). Elles sont stratégiquement situées à l'interface entre l'environnement et l'organisme, au niveau du compartiment muqueux (Golebski et al., 2019). Les ILC sont également capables de répondre précocement aux agents pathogènes, en sécrétant des cytokines, qui initient des réponses en interaction synergique avec les cellules myéloïdes (Mortha and Burrows, 2018). En plus de leur rôle dans le cadre pathologique, les ILC participent également au maintien de l'homéostasie et de l'intégrité de la barrière épithéliale et dans la réparation et la modelage des tissus (Hazenberg and Spits, 2014c). Cette ambivalence fait de ces cellules des acteurs émergents incontournables de la régulation et l'entretien du corps (Sciumè et al., 2017). La figure 1.7 représente les principes rôles d'ILC qui sont activées par plusieurs pathogènes comme : les microbes intracellulaires, les tumeurs, champignons, allergènes...

Chapitre 1. Revue de la littérature

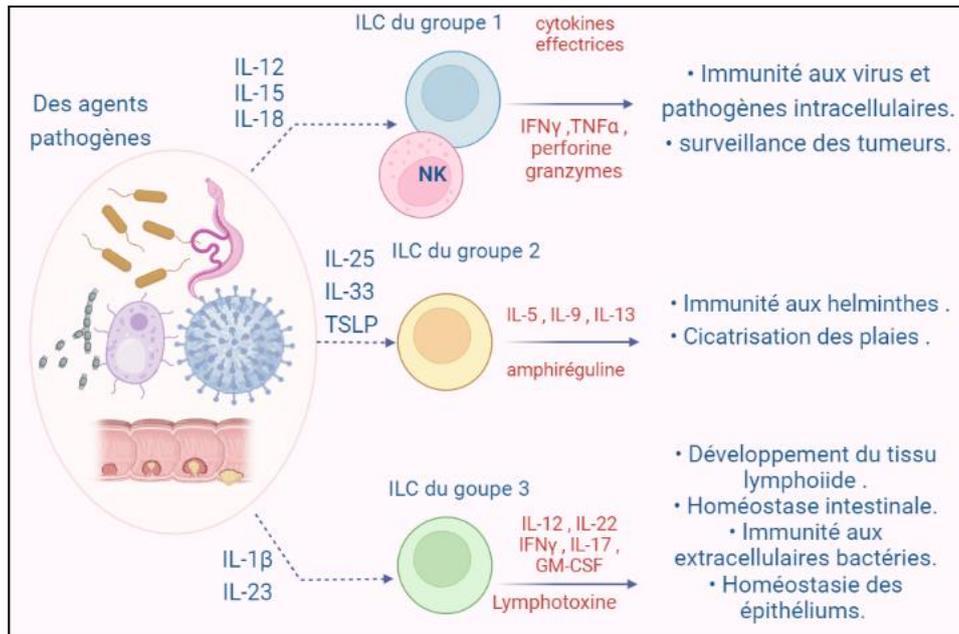


Figure 1.7. Fonctions des ILCs (Eberl et al., 2015). Les sous-ensembles ILC1, ILC2, et ILC3 sont activés rapidement par des signaux tissulaires et agissent donc au début de la réponse immunitaire par la production des cytokines. **GM-CSF**: facteur de stimulation des colonies de granulocytes et macrophages, **IL**: interleukine, **NK**: cellule natural killer, **TSLP**: lymphopoïétine stromale thymique.

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.2. Récepteur Orphelin gamma t lié à la protéine RAR (ROR γ t)

1.2.1 Généralité

IL existe trois formes connues des récepteurs ROR (Retinoic acid receptor related Orphan Receptor), nommés (ROR α), (ROR β), (ROR γ), également appelés NR1F1, NR1F2 et NR1F3 (d'après le comité de nomenclature des récepteurs nucléaires) (Rutz et al., 2016a). Ils appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires (NR) (Zhang et al., 2015) de la sous-famille des facteurs de transcription intracellulaires qui sont codés par les gènes RORA, RORB, RORC, respectivement (Abdel-Magid, 2015). Chacun des trois membres des familles ROR présentent son propres profils d'expression (Fan et al., 2018).

Les facteurs de transcription ROR peuvent agir en tant que répresseurs ou activateurs de la transcription du gène cible en fonction de leur recrutement de corépresseurs ou de coactivateurs avec leurs domaines de liaison au ligand (LBD, Ligand Binding Domain) (Castro et al., 2017).

1.2.2. Gène de Récepteur Orphelin C lié à la protéine RAR (RORC)

Le gène *RORC* est localisé sur le chromosome 1q 21.3 chez l'homme (Rutz et al., 2016b) et sur le chromosome 3 chez la souris (figure 1.8) (Boukhtouche, 2006). Ce gène couvre une région génomique de 24 Kilobase (Kb) composée de 11 Exons (Fan et al., 2018). Chez l'homme et la souris, *RORC* est exprimé sous forme de deux isoformes différentes ROR γ (ROR γ 1) et ROR γ t (ROR γ 2) (Castro et al., 2017).

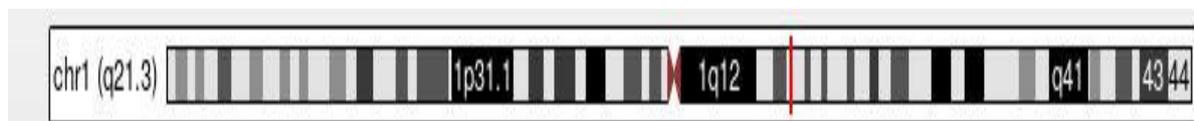


Figure 1.8. Localisation chromosomique du gène *RORC* (D'après NCBI)

1.2.3. Transcription des isoformes ROR

Les deux isoformes du gène *RORC* utilisent les neuf derniers exons (exons 3-11), mais les exons 1 et 2 sont transcrits différemment, ce qui conduit à deux isoformes différentes. En conséquence, l'ARN de ROR γ t est de 100 nucléotides plus petit que celui de ROR γ , ce qui se traduit par une séquence d'acides aminés (aa) N-terminale plus petite: 495 aa pour ROR γ t contre 516 aa pour ROR γ chez la souris, et 508 aa pour ROR γ t contre 518 aa pour ROR γ chez l'homme (Kumar et al., 2021). Figure 1.9 représente les structures et les domaines des isoformes de ROR γ et ROR γ t.

Chapitre 1. Revue de la littérature

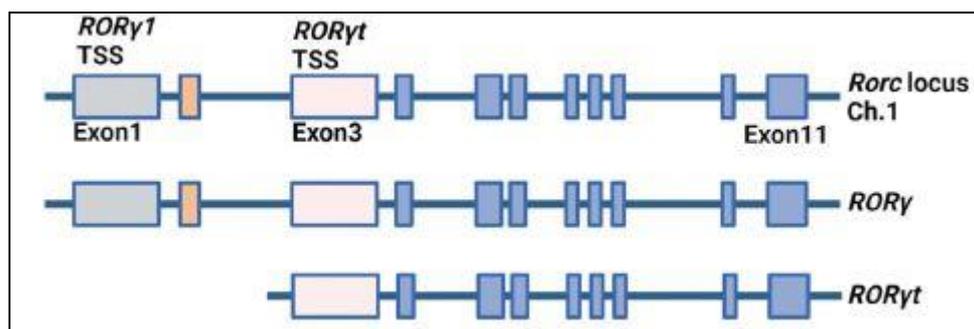


Figure 1.9. Locus *Rorc/RORC* et utilisation alternative des promoteurs pour les différentes isoformes chez la souris et l'homme (Kumar et al., 2021). Le site de début de transcription (TSS) pour *RORγ* sur l'Exon 1 est représenté en gris clair et pour *RORγt* sur l'Exon 3 en rose.

1.2.4. Profils d'expression du gène *RORC*

Les deux isoformes *RORγ* et *RORγt* présentent un modèle distinct d'expression spécifique aux tissus et sont impliquées dans la régulation de différents processus physiologiques (Jetten, 2009). L'isoforme *RORγ* a été détecté dans plusieurs tissus dont le rein, le foie, le poumon, le muscle, le cœur et le cerveau. L'expression de *RORγt* est limitée aux tissus lymphoïdes comme le thymus (Rutz et al., 2016c), et à un certain types de cellules immunitaires, notamment les thymocytes (les cellules T helper 17, Th17) et Tc17, les cellules T gamma delta ($T\gamma\delta$), les cellules ILC3, les LTi, NK (Castro et al., 2017).

1.2.5. Récepteur nucléaire *RORγt*

RORγt présente l'architecture structurelle typique de tous les NR (figure 1.10). Il est composé de quatre domaines fonctionnels majeurs: un domaine variable amino-terminale (A/B) contenant l'hélice de la fonction d'activation 1 (AF1), un domaine de liaison à l'ADN (DBD), un domaine charnière flexible et un domaine de liaison au ligand C-terminal (LBD) (Chen et al., 2021). Le DBD contient deux doigts de zinc hautement conservés et impliqués dans la reconnaissance d'éléments d'ADN (Rutz et al., 2016d) et un ensemble typique de 12 hélices α canoniques (H1-H12), et deux autres hélices H2' et H11' (Chen et al., 2021).



Figure 1.10. Structure du *RORγt* murin (Fauber and Magnuson, 2014). Domaine amino-terminal (A/B ou AF1), domaine de liaison à l'ADN (DBD), région charnière, domaine de liaison au ligand (LBD), et hélice-2 de la fonction d'activation (AF2) représenté en violet.

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.2.6. Fonctions de ROR γ t

Le récepteur ROR γ t est un récepteur nucléaire et un facteur de transcription qui régule une variété de processus immunologiques et joue un rôle indispensable dans le développement de tous les lymphocytes T, comme les cellules Th17, source de l'IL-17 (Matsumoto et al., 2013). De plus, ROR γ t est essentiel pour la génération de cellules LTi, qui sont impliquées de manière critique dans la maturation des tissus lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques et les plaques de Peyer (Spits and Di Santo, 2011). En outre, les ILC3 sont caractérisées par l'expression du facteur de transcription ROR γ t qui est essentiel pour leur développement et leur fonction (Killig et al., 2014). ROR γ t intervient dans la réponse contre les infections bactériennes et fongiques, dans l'auto-immunité et aussi à la réponse antitumorale (Eberl, 2017). La figure 1.11 représente les principaux rôles de ROR γ t.

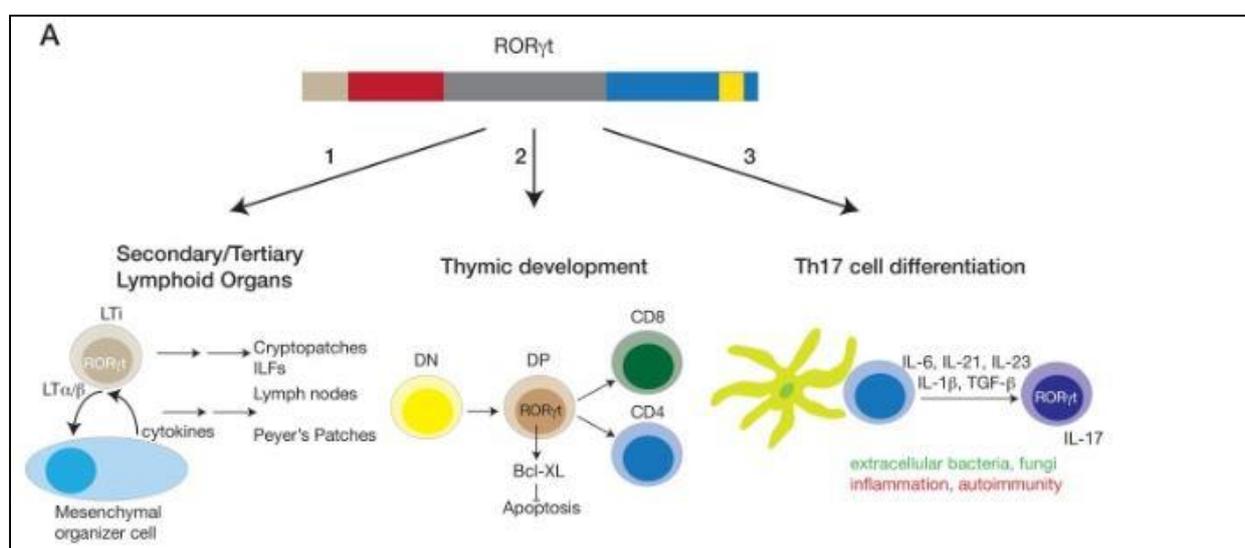


Figure 1.11. Fonctions de ROR γ t (Rutz et al., 2016e). (1) Le développement des cellules LTi dépend de l'expression de ROR γ t. L'interaction entre les LTi et les cellules organisatrices mésenchymateuses est nécessaire au développement des organes lymphoïdes. (2) Pendant le développement des thymocytes, ROR γ t est exprimé dans les cellules doublement positives (DP). Ce facteur est nécessaire à la survie de ces cellules en contrôlant l'expression du facteur de survie Bcl-xL. (3) ROR γ t est le facteur de transcription principal des cellules T helper17 (Th17), source de l'IL-17. ROR γ t est induit dans les cellules CD4T naïves lors de leur activation par une cellule présentatrice d'antigène en présence des cytokines précises. **Bcl-xL**: B-cell lymphoma-extra large, **DN**: double négatif, **DP**: double positif, **IL**: interleukine, **LTi**: cellules inductrices des tissus lymphoïdes.

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.3. Infections fongiques

Les champignons ou fungi sont des organismes qu'ils constituent un royaume distinct et sont considérés comme des eucaryotes hétérotrophes (de Pauw, 2011). Les champignons peuvent être soit des levures (unicellulaires) ou des moisissures (plusieurs cellules formant de longs filaments étroits appelés hyphes) (Romani, 2011a). Certains de ces champignons sont utilisés pour le bien de l'humanité, mais d'autres sont pathogènes et provoquent des infections fongiques (Janbon et al., 2019).

Les infections fongiques peuvent être superficielles muqueuses ou invasives (Ankrah et al., 2016). Elles peuvent être séparées en deux catégories : opportunistes et primitives (Kauffman, 2009). Les infections fongiques représentent un grave danger pour la santé et provoquent des maladies fongiques qui sont un paradigme important en immunologie car elles peuvent résulter soit d'un manque de reconnaissance par le système immunitaire, soit d'une suractivation de la réponse inflammatoire (Romani, 2011b)

1.3.1 Immunité anti-fongique

Le système immunitaire est la partie la plus importante du système de défense du corps contre les virus, les bactéries et les champignons. Il est composé de cellules immunitaires spécialisées (Zheng and Zhu, 2022), notamment les ILCs comme étant effecteurs essentiels de l'immunité innée (Stehle et al., 2018b).

1.3.1.2. Immunité anti-fongique médiée par l'interleukine 17(IL-17)

L'IL-17 (IL-17A) est considéré comme un médiateur clé de la protection de l'hôte contre les microbes extracellulaires et les champignons (Sawada et al., 2021a), par l'induction d'un profil de gènes caractéristiques comprenant des cytokines pro-inflammatoires, des peptides antimicrobiens et des chimiokines (figure 1.12) (Mengesha and Conti, 2017a). Des études expérimentales réalisées chez l'homme et chez la souris révèlent le rôle important de l'IL-17 dans la protection contre *Candida albicans* (*C. albicans*), microbe commensal de la cavité buccale du tractus gastro-intestinal, et des muqueuses reproductives (Conti and Gaffen, 2015).

Cette cytokine est principalement produite par les cellules Th17. Il existe d'autres sources cellulaires innées d'IL-17, appelées cellules de "type 17", ces cellules dépendent de l'expression de l'IL-23 et de ROR γ t pour fonctionner et produire de l'IL-17. Ces cellules comprennent les LT γ δ , les nTh17, les NKT, les LTi et les ILC3 (Mengesha and Conti, 2017b).

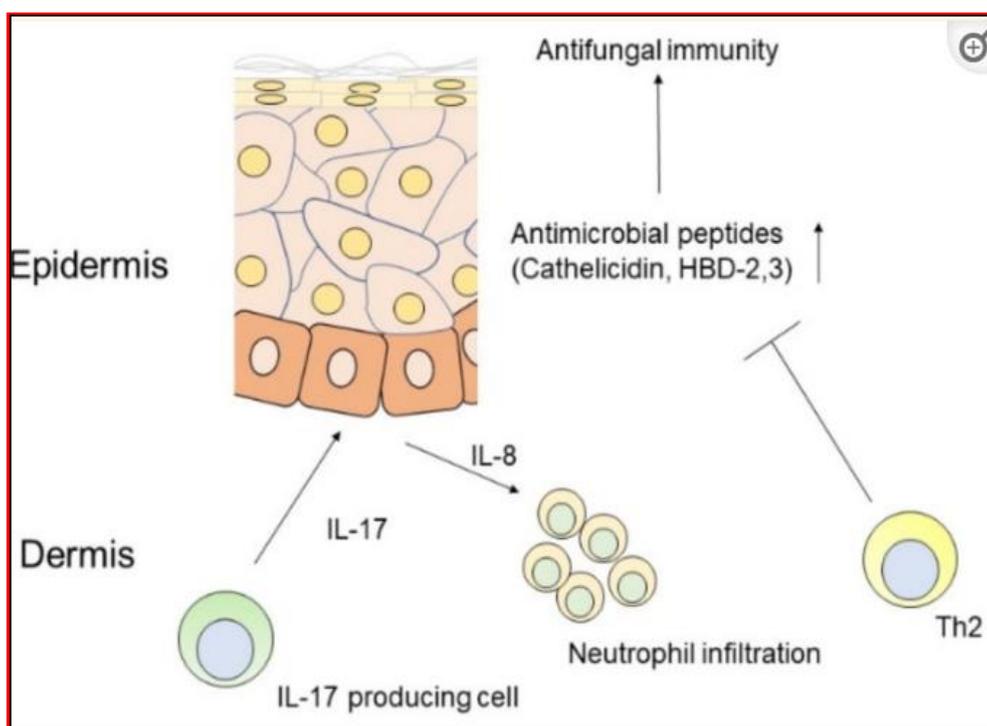


Figure 1.12. Schéma des réponses immunitaires antifongiques médiées par l'IL-17 dans la peau (Sawada et al., 2021b). L'IL-17 assure un rôle essentiel dans la défense de l'hôte contre les micro-organismes par le recrutement des neutrophiles et la production des peptides anti-microbiens.

1.3.1.3 Rôle de l'ILC3 dans la réponse anti-fongique

Il a été montré que les ILC3 sont impliquées dans la lutte contre les infections fongiques. L'IL-17 produite par les LT recrute des neutrophiles qui sont essentiels pour la protection contre les agents pathogènes fongiques (Bresler, 2018). Les lymphocytes Th17 sont considérés comme la principale source d'IL-17. L'infection de souris Rag 27⁻ (Rag: *Recombination Activating Gene*) par le pathogène *C. albicans* a induit un recrutement très rapide d'ILC sécrétant l'IL-17 (Gladiator et al., 2013). De plus, La déplétion des ILC favorise la persistance des pathogènes au site d'infection (langue, muqueuse, oropharyngée). Ces résultats suggèrent que les ILC3 jouent un rôle important dans la protection contre ce pathogène en absence de lymphocytes T et B. Les chercheurs ont confirmé ces résultats en utilisant des souris *Rorc*⁷ dépourvues de cellules Th17 et d'ILC3. Par conséquent, ILC3 peut participer à la protection de l'hôte contre une infection médiée par *C. albicans* en sécrétant de l'IL-17 de la même manière que les Th17 (Bresler, 2018).

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.4. PCR

1.4.1. Définition

PCR ou réaction de polymérisation en chaîne "*Polymerase Chain Reaction*" a été théoriquement décrite par Keppe et ses collègues en 1971 ; mais il a fallu attendre 14ans pour que la procédure PCR compète soit décrite et appliquée expérimentalement par Kary Mullis en 1985 (Lorenz, 2012). C'est une technique largement utilisée dans les sciences fondamentales et biomédicales permettant l'amplification *in vitro* des acides nucléiques (Ghannam and Varacallo, 2022a).

1.4.2. Principe

Les principaux composants de la PCR sont : la matrice, les amorces, les bases nucléotidiques libres et l'enzyme ADN polymérase. La matrice d'ADN contient la région spécifique que nous souhaitons amplifier. Les amorces, ou oligonucléotides, sont de courts brins d'ADN complémentaires de l'extrémité 3' de chaque région cible (Ghannam and Varacallo, 2022b) (Figure 1.13)

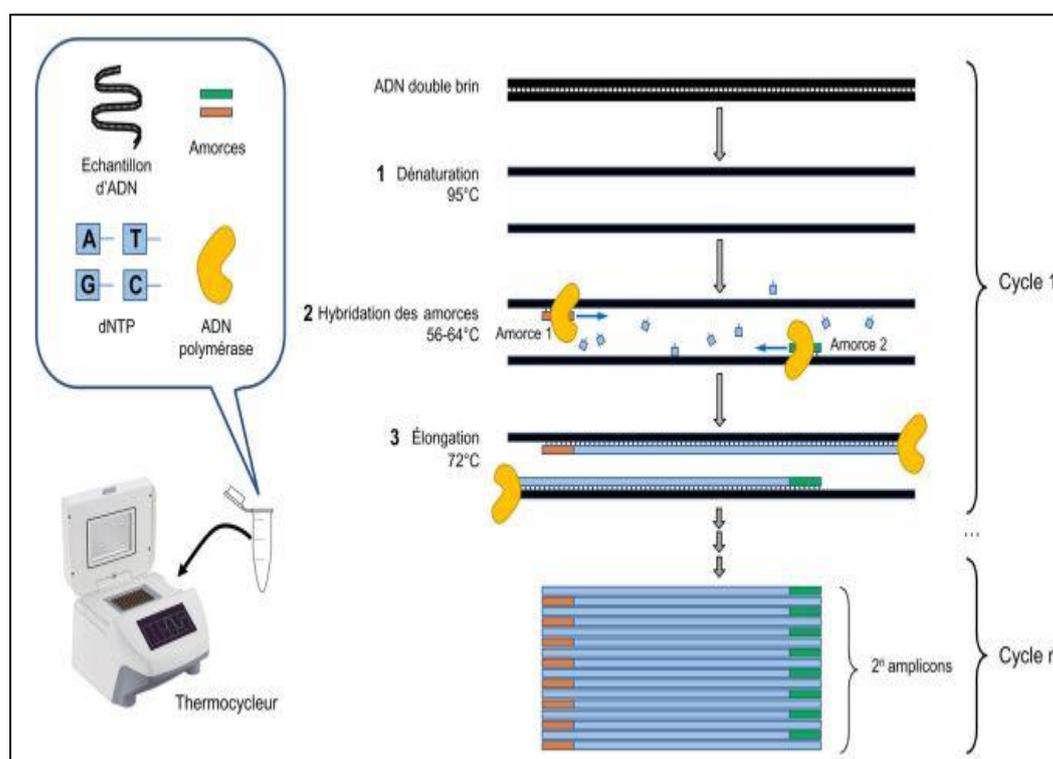


Figure 1.13. Principe de la PCR (Uhel and Zafrani, 2019) .

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.4.3. Etapes de PCR

Chaque cycle de PCR comporte trois étapes essentielles (Yilmaz et al., 2012) :

1. Dénaturation: Une forte température, entraîne la dénaturation de l'ADN double brin qui se sépare en ADN simple brin, par la rupture des liaisons d'hydrogènes entre les paires de bases. Cette étape est généralement courte, entre 10s et 30s et se réalise à une température comprise entre 92°C et 96°C (Klančnik et al., 2012).
2. La température est ensuite abaissée (50°C-65°C) (Shahi et al., 2018) pour permettre aux amorces spécifiques de se lier aux segments d'ADN cibles. Ce processus est connu sous le nom d'hybridation (Garibyan and Avashia, 2013).
3. La température est à nouveau augmentée (72°C), l'ADN polymérase est alors capable d'étendre les amorces en ajoutant des nucléotides au brin d'ADN, donc de nouveaux brins d'ADN complémentaires sont synthétisés par l'élongation des amorces et l'enzyme ADN polymérase (Shahi et al., 2018).

À chaque répétition de ces trois étapes, le nombre de molécules d'ADN copiées double (Garibyan and Avashia, 2013).

1.4.4. Applications de la PCR

PCR est devenue une technique utilisée dans de nombreuses applications, notamment le clonage de gènes, le diagnostic de maladies infectieuses et le dépistage d'anomalies génétiques délétères chez les enfants en gestation (Ghannam and Varacallo, 2022a).

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.5. Conception des amorces

La conception d'amorces appropriées est essentielle à la réussite d'une expérience de PCR. Lorsque l'on conçoit un ensemble d'amorces pour une région spécifique. L'ADN que l'on souhaite amplifier, une amorce doit s'hybrider au brin positif, qui par convention est orienté dans la direction 5'→3'(brin sens), et l'autre amorce doit compléter le brin qui est orienté dans la direction 3'→5'(brin anti-sens ou matrice)(Lorenz, 2012).

1.5.1. Critères de choix de bonnes amorces

Quelques problèmes courants se posent lors de la conception d'amorces:

- L'auto-annexion des amorces entraînant la formation de structures secondaires telles que les boucles en épingle à cheveux (Chavali et al., 2005).
- L'annelage des amorces entre elles, plutôt qu'avec la matrice d'ADN, ce qui crée des dimères d'amorces.
- Des températures de fusion (T_m) radicalement différentes pour chaque amorce, ce qui rend difficile la sélection d'une température d'hybridation permettant aux deux amorces de s'associer efficacement (Lorenz, 2012).
- La longueur des amorces doit être de 18 à 30 résidus nucléotidiques (bases).
- La teneur optimale en G-C doit être comprise entre 40 et 60%(Welch, 2012).
- L'extrémité 3' des amorces doit contenir un G ou un C afin de bloquer l'amorce et d'empêcher la "respiration" des extrémités, ce qui augmente l'efficacité de l'amorçage(Lorenz, 2012).

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.6. Problématique et objectifs

1.6.1. Problématique

Les ILCs sont un composant essentiel du système immunitaire chez les vertébrés. Ces cellules se développent à partir de la lignée lymphoïde et peuvent se différencier en au moins trois lignées transcriptionnellement distinctes. Fonctionnellement, les ILC ont un rôle dans l'inflammation, le remodelage des tissus, et la défense microbienne, par la production des cytokines (telles que IFN γ , IL-13, IL-17, IL-22). ROR γ t est le facteur de transcription, qui est requis pour le développement, le maintien et la fonction des ILC3 qui sont impliqués dans l'élimination des infections bactériennes et fongiques. L'étude de l'expression de ce récepteur nucléaire lors des infections fongiques permet d'explorer des cibles thérapeutiques innovantes qui régulent l'activation et les fonctions des ILC.

1.6.2. Objectif

Concevoir des amorces encadrant l'exon 4 du gène *RORC* exprimé par les ILC3 lors des infections fongiques.

1.6.3. But

Amplifier le gène *RORC* par PCR et étudier son implication dans l'élimination des infections fongiques.

Chapitre 1. Revue de la littérature

Chapitre 2. Matériel et méthodes

Chapitre 2. Matériel et méthodes

2.1. Conception des amorces pour le gène *RORC*

2.1.1. Recherche de la séquence du gène *RORC*

La conception des amorces encadrant le gène *RORC* débute par la recherche de sa séquence de référence dans une base de données de génomes. Dans le cadre de notre travail, on utilise la base de données «Ensembl» [www.ensembl.org] (Figure 2.1, 2.2 et 2.3).

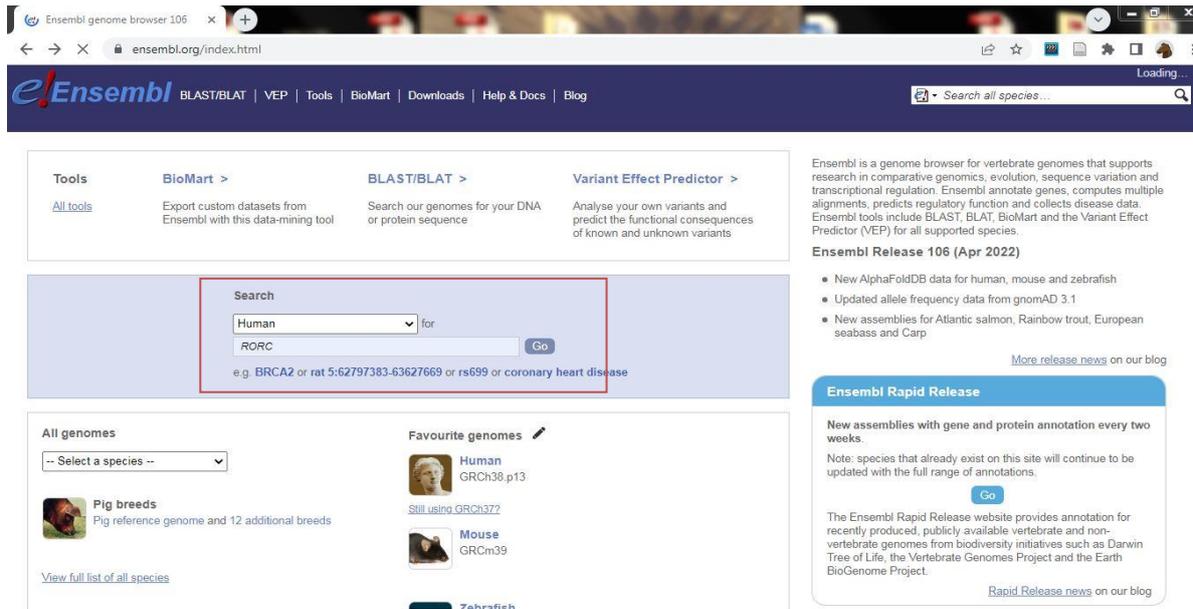


Figure 2.1. Plateforme de la base de données Ensembl. On précise l'espèce Humaine et le nom du gène *RORC* ensuite on clique sur GO pour afficher les résultats (encadrés en rouge).

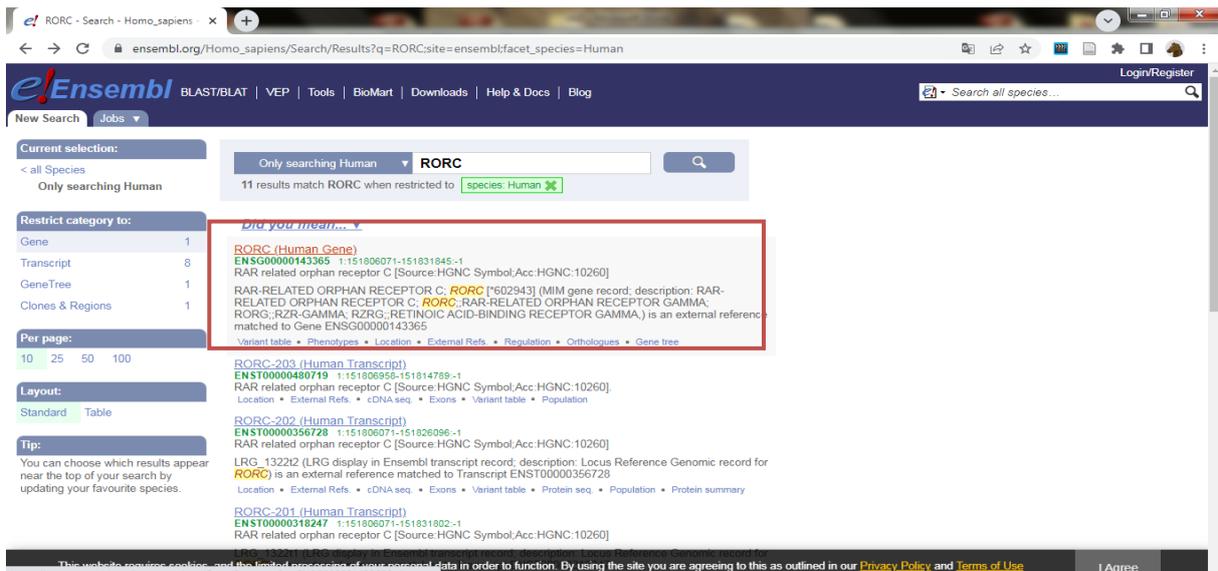


Figure 2.2. Résultats de la recherche du gène *RORC*. On clique sur le premier résultat de recherche pour vérifier qu'il s'agit bien du gène recherché et qu'il correspond à l'espèce humaine.

Chapitre 2. Matériel et méthodes

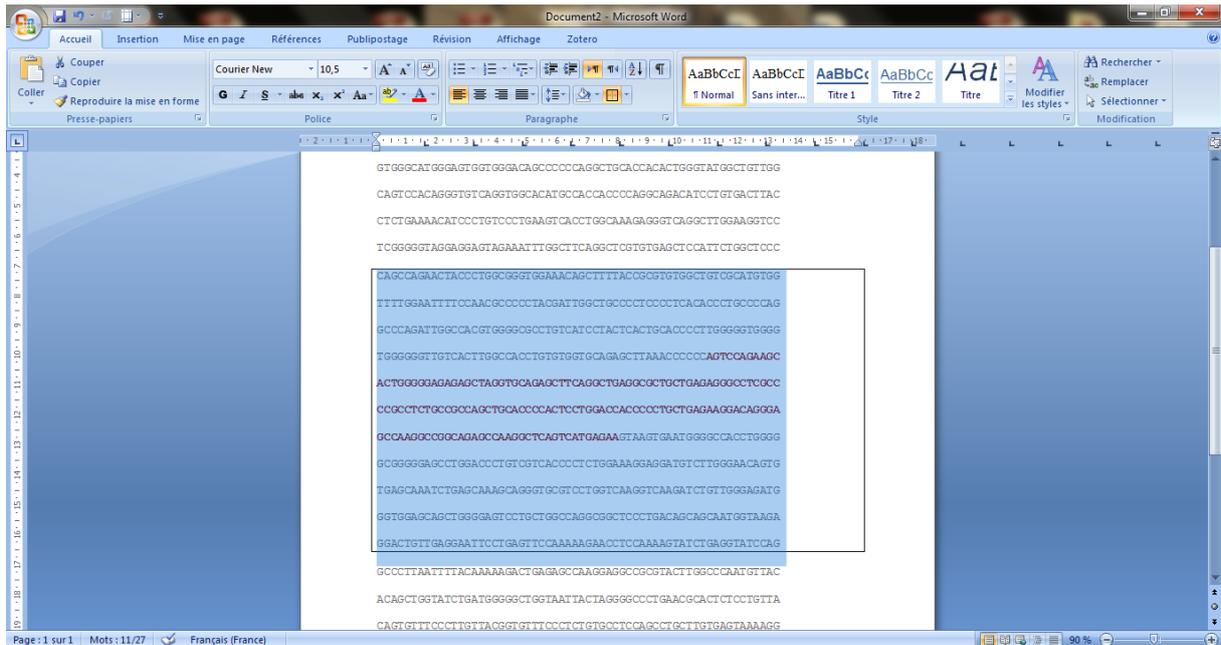


Figure 2.5. La séquence d'intérêt.

2.1.2. Design des primers : outil Primer-Blast

Pour créer des amorces spécifiques à la séquence d'intérêt du gène *RORC* que nous cherchons à amplifier, nous avons utilisé l'outil Primer-BLAST (figure 2.6). Cet outil se trouve dans la base de données du National Center for Biotechnology information (NCBI) [www.ncbi.nih.gov]. Les figures 2.6 ,2.7 et 2.8 montrent les étapes à respecter pour l'utilisation de cet outil.

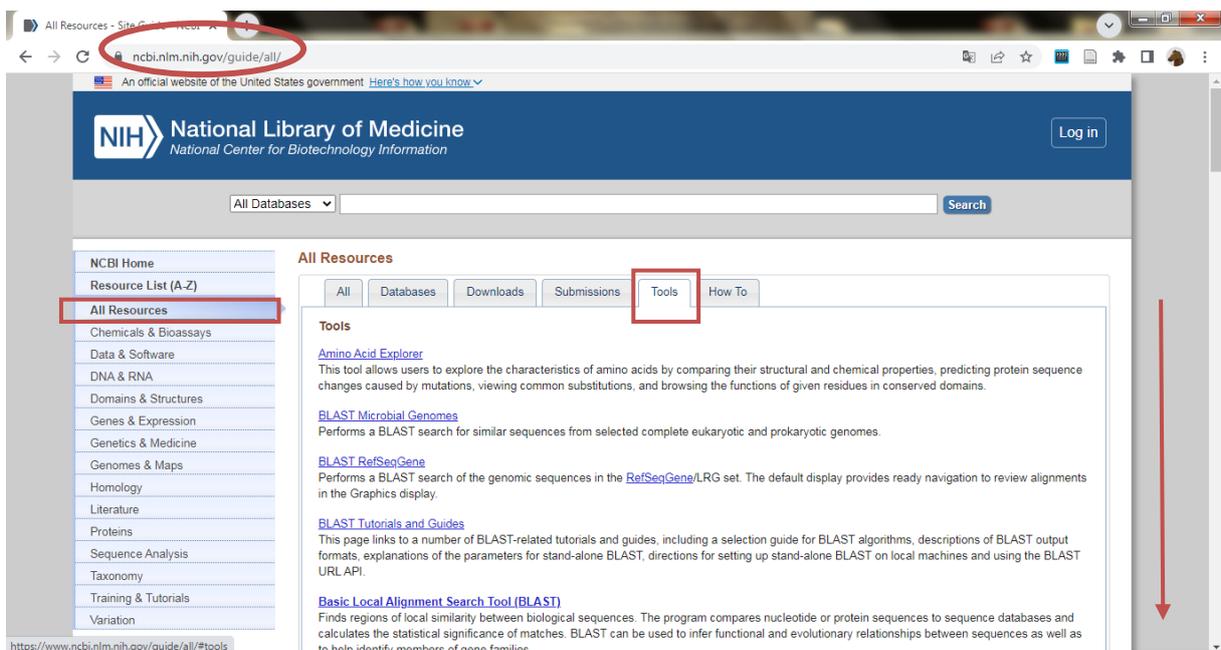


Figure 2.6. Plateforme de la base de données NCBI.

Chapitre 2. Matériel et méthodes

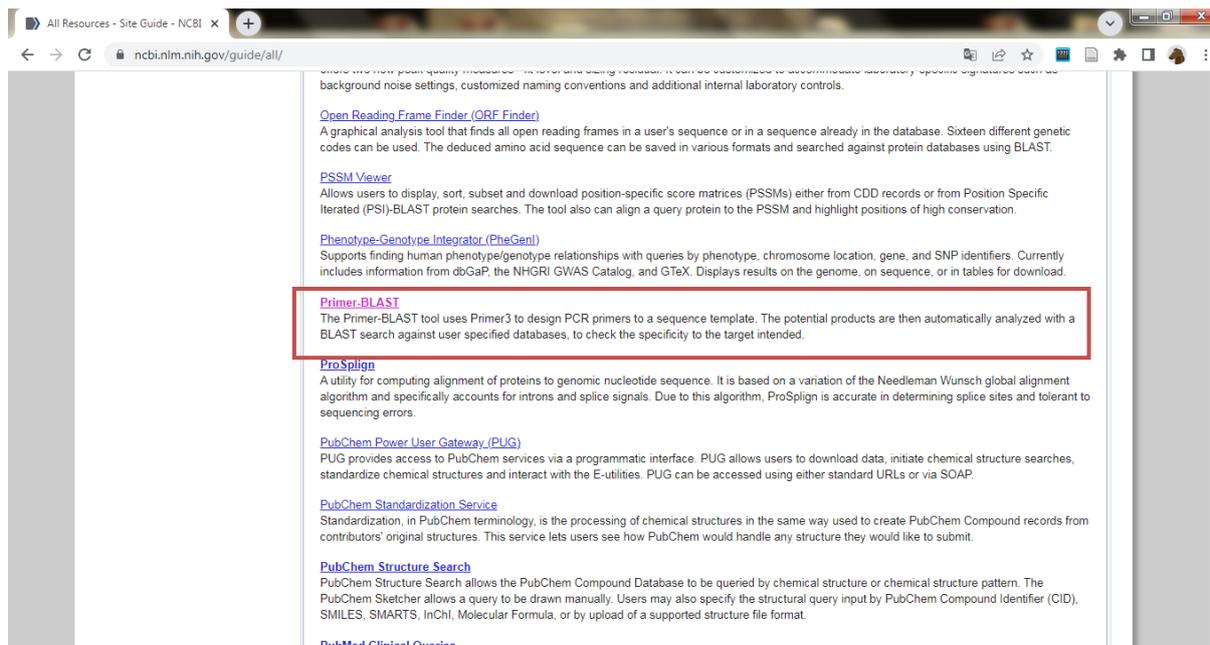


Figure 2.7. L'outil Primer-Blast.

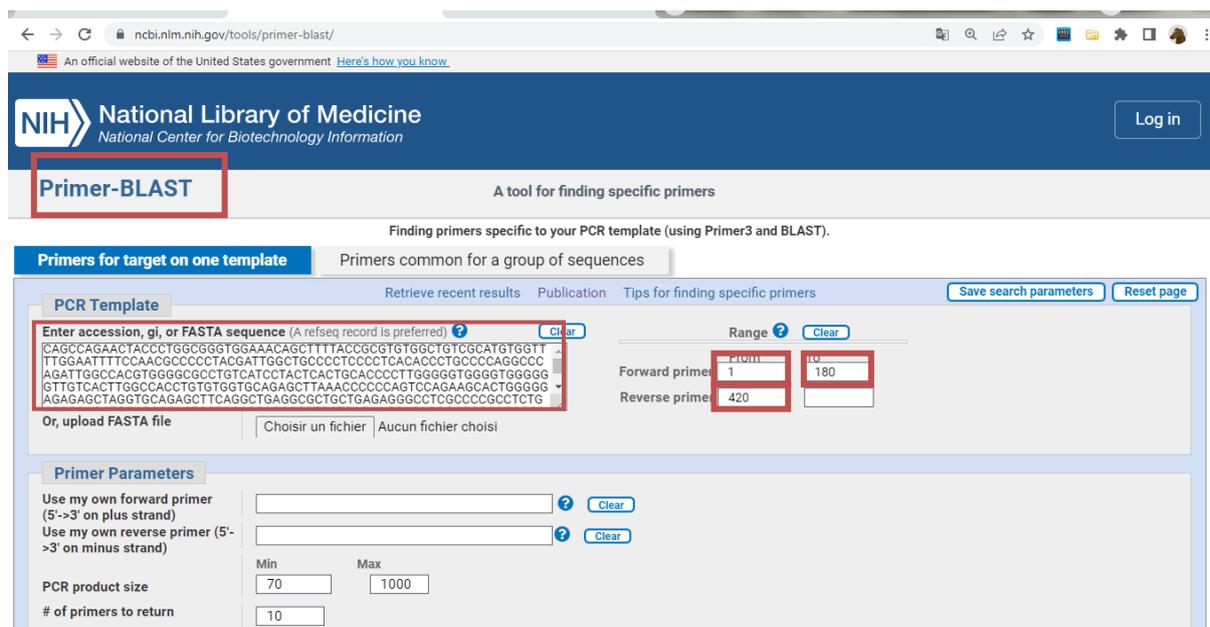


Figure 2.8. L'outil Primer-Blast. On copie la séquence encadrée (Exon 04) et la colle dans la case « FAST ». On efface les espaces entre les lignes, puis on fixe les amorces sens et anti-sens (Forward et Reverse primers).

Plusieurs paramètres doivent être pris en compte lors de la conception des amorces pour obtenir les résultats (Figure 2.9).

Chapitre 2. Matériel et méthodes

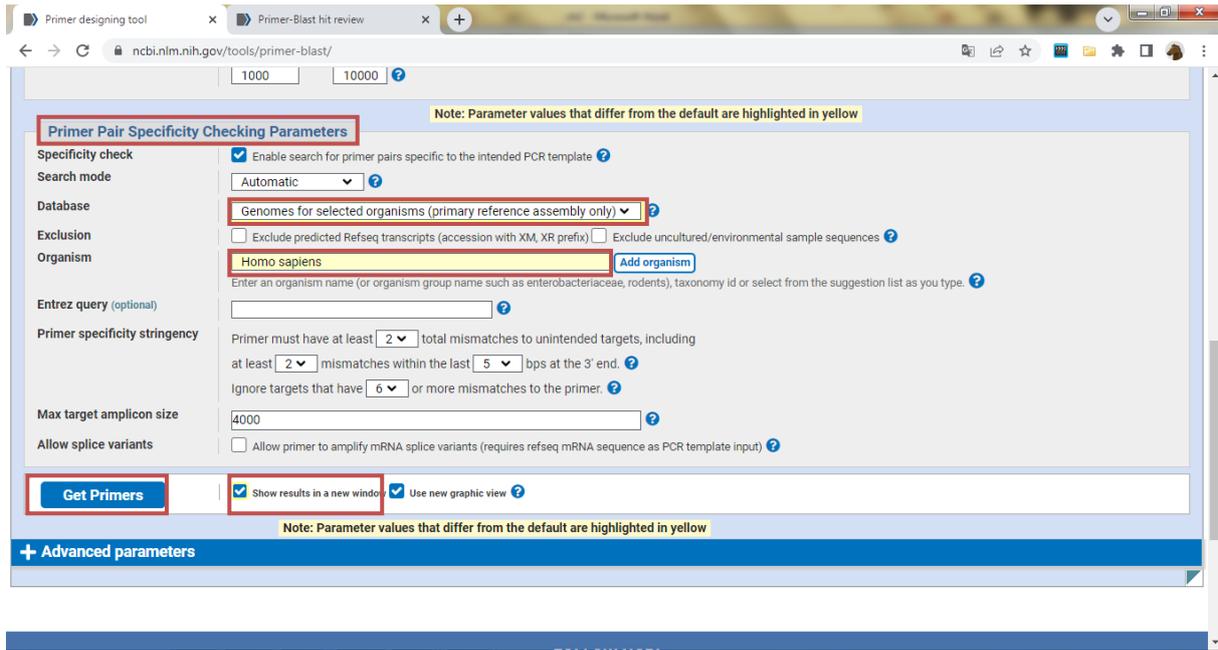


Figure 2.9. Primer Pair Specificity Checking Parameters.

2.1.3. Confirmation des résultats : *in-silico* PCR

L'analyse confirmatoire des séquences d'amorces choisie par PCR *in silico* (PCR virtuelle), qui est effectuée par un programme de la plateforme «UCSC genome browser » (genome.ucsc.edu.) (Figure 2.10).



Figure 2.10. La plateforme « UCSC genome browser ».

Chapitre 3. Résultats et discussion

Chapitre 3. Résultats et discussion

3.1. Résultats de la conception des amorces

3.1.1. Résultats du Primer-BLAST

Pour désigner des amorces spécifiques du gène *RORC*, nous avons utilisé le site Ensembl afin de découvrir l'intégrité du gène *RORC*. Ce gène est composé de 11 exons. Dans la présente étude, nous avons choisi recherche l'exon 04, pour avoir l'amorce spécifique du gène *RORC*. L'outil Primer-Blast nous a permis d'obtenir 10 paires d'amorces propres au gène *RORC* de l'exon 04.

Les résultats obtenus sont indiqués dans la figure 3.1.

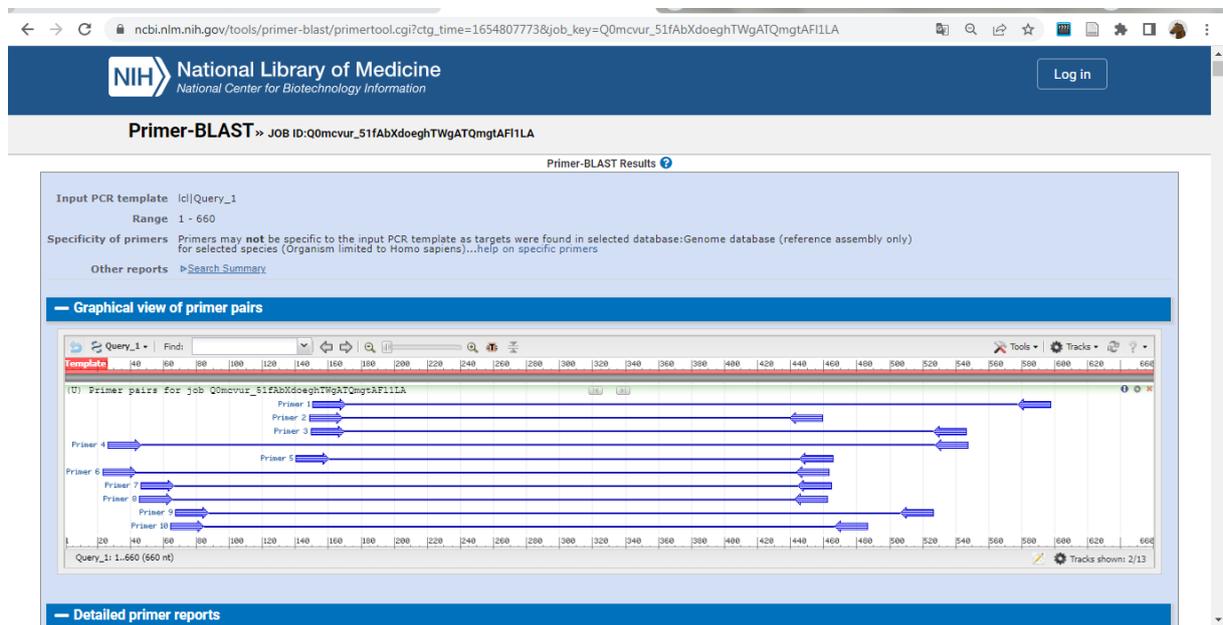


Figure 3.1. Les amorces. En rouge c'est la séquence complète et les flèches en bleu représentent les différentes amorces.

Primer pair 4									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AACAGCTTTTACGGGTGTG	Plus	20	27	46	59.69	50.00	6.00	2.00
Reverse primer	CTCCACCCATCTCCCAACAG	Minus	20	547	528	59.75	60.00	2.00	1.00
Product length	521								

Figure 3.2. Primer pair 4.

Chapitre 3. Résultats et discussion

Nous avons choisi la quatrième paire d'amorces " Primer pair 4 " pour les raisons suivantes (Figure 3.3) :

- **Température de fusion (TM)** : L'amorce sens 59,69°C, et anti sens 59,75°C.
- **Longueur (Length)** : Les amorces sens et anti sens 20 nucléotides.
- **Teneur en GC (GC%)** : Sens 50%, anti sens 60%.
- **Amorce spécifique** : moins de 1000 paire de base (521).
- **Produits aspécifiques** : tous plus de 1000 paires de base (>1000).

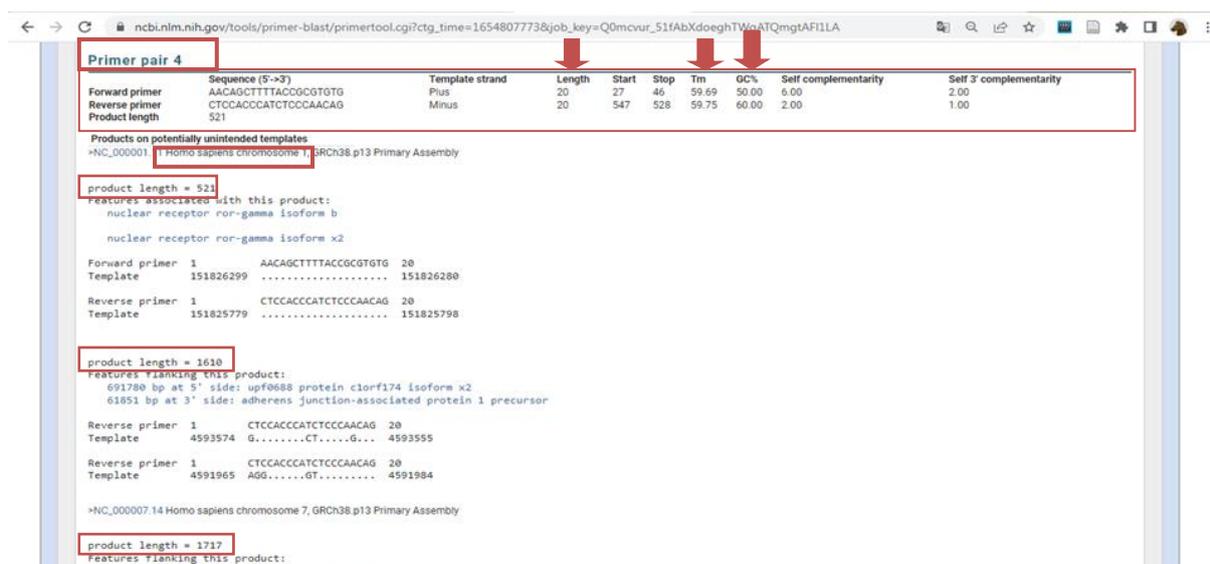


Figure 3.3. Résultat du Primer-Blast.

On a ensuite localisé notre paire d'amorces dans la séquence du gène RORC (Figure 3.4).

3.1.2. Résultats de la confirmation par *In-silico* PCR

Les résultats obtenus par (*In-silico* PCR) ont été confirmés par l'utilisation de plateforme «UCSC genome browser», dans lequel assure que nos paires d'amorces se localisent sur le chromosome 1, et la taille du produit spécifique obtenu (521 pb), en raison de ceci nous avons prouvé la spécificité et la fiabilité des amorces conçues (figure 3.5).

Chapitre 4. Conclusions et perspectives

Chapitre 4. Conclusions et perspectives

La découverte de la famille ILC représente une avancée importante dans la compréhension du développement du système immunitaire inné. Ces cellules jouent différents rôles physiologiques, notamment la protection de l'hôte contre les infections, la réparation des blessures et l'homéostasie. Parallèlement au sous ensemble classique de cellules T helper, les ILC peut également contribuer à l'immunité contre les agents pathogènes fongiques dont le champignon le plus étudié est le *Candida albicans*. Trois groupes d'ILC ont été définis : ILC1 qui exprime T-bet et sécrète l'IFN γ ; ILC2 qui exprime GATA3 et produit l'IL-5 et de l'IL-13 ; et ILC3 qui exprime le récepteur nucléaire ROR γ t et sécrète l'IL-17 et IL-22. Les ILC ont une capacité d'aider à contrôler l'infection et la colonisation fongique. Cependant, de nombreux défis subsistent, y compris la nature de la capacité fonctionnelle des ILC pendant la vie d'un individu "sain" ou pendant une inflammation ou une infection.

ROR γ t, le facteur de transcription codée par le gène *RORC*, est considéré comme l'un des principaux régulateurs du développement des ILC. Il est exprimé sélectivement dans le thymus et d'autre tissus du système immunitaire ce qui lui donne un rôle majeur. La biologie de ROR γ t se développe à un moment important où l'immunologie devient un domaine de recherche plus large qui relie divers systèmes physiologiques.

L'objectif de ce travail est de désigner des amorces pour le gène *RORC* dans le but d'étudier, par PCR, son expression par les ILC lors des infections fongiques, pour une mieux compréhension du devenir des infections fongiques et la recherche des thérapies antifongiques.

Chapitre 5. Références bibliographiques

Chapitre 5. Références bibliographiques

A

Abdel-Magid, A.F. (2015). RORc Modulators for the Treatment of Autoimmune Diseases. *ACS Med. Chem. Lett.* 6, 958–960. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.5b00313>.

Abubakar, M., Mehmood, F., Jeelani, A., and Arshed, M.J. (2012). Application of PCR in Diagnosis of Peste des Petits Ruminants Virus (PPRV) (IntechOpen).

Ankrah, A.O., Sathekge, M.M., Dierckx, R.A.J.O., and Glaudemans, A.W.J.M. (2016). Imaging fungal infections in children. *Clin. Transl. Imaging* 4, 57–72. <https://doi.org/10.1007/s40336-015-0159-2>.

Artis, D., and Spits, H. (2015). The biology of innate lymphoid cells. *Nature* 517, 293–301. <https://doi.org/10.1038/nature14189>.

B

Bal, S.M., Bernink, J.H., Nagasawa, M., Groot, J., Shikhagaie, M.M., Golebski, K., van Drunen, C.M., Lutter, R., Jonkers, R.E., Hombrink, P., et al. (2016). IL-1 β , IL-4 and IL-12 control the fate of group 2 innate lymphoid cells in human airway inflammation in the lungs. *Nat. Immunol.* 17, 636–645. <https://doi.org/10.1038/ni.3444>.

Bernink, J.H., Peters, C.P., Munneke, M., te Velde, A.A., Meijer, S.L., Weijer, K., Hreggvidsdottir, H.S., Heinsbroek, S.E., Legrand, N., Buskens, C.J., et al. (2013). Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nat. Immunol.* 14, 221–229. <https://doi.org/10.1038/ni.2534>.

Boukhtouche, F. (2006). Rôle du récepteur nucléaire ROR α dans la survie et la différenciation neuronale. Undefined 237. .

Bresler, P. (2018). Étude de la régulation des cellules lymphoïdes innées par les lymphocytes T chez la souris. These de doctorat. Sorbonne Paris Cité.

Brown, G.D., and Wilson, D. (2019). Mammalian innate immunity to fungal infection. *Semin. Cell Dev. Biol.* 89, 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.06.004>.

C

Castro, G., Liu, X., Ngo, K., De Leon-Tabaldo, A., Zhao, S., Luna-Roman, R., Yu, J., Cao, T., Kuhn, R., Wilkinson, P., et al. (2017). ROR γ t and ROR α signature genes in human Th17 cells. *PLoS One* 12, e0181868. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181868>.

Cella, M., and Romagnani, C. (2019). Differentiation and Mechanisms of Activation of Innate Lymphoid Cells (Frontiers Media SA).

Cella, M., Fuchs, A., Vermi, W., Facchetti, F., Otero, K., Lennerz, J.K.M., Doherty, J.M., Mills, J.C., and Colonna, M. (2009a). A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature* 457, 722–725. <https://doi.org/10.1038/nature07537>.

Charlotte VIANT, VIVIER, E., and UGOLINI, S. (2016). Régulation du développement et de la fonction des cellules innées lymphoïdes NKp46+. Aix-Marseille Université UFR Science-Ecole doctorale des Science de la Vie et de la Santé.

Chen, Q., Wang, F., and Zhou, B. (2021). Investigations of retinoic acid receptor-related orphan receptor-gamma t (ROR γ t) agonists: a combination of 3D-QSAR, molecular docking

Chapitre 5. Références bibliographiques

and molecular dynamics. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 39, 3501–3514.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1765873>.

Chavali, S., Mahajan, A., Tabassum, R., Maiti, S., and Bharadwaj, D. (2005). Oligonucleotide properties determination and primer designing: a critical examination of predictions. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 21, 3918–3925. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti633>.

Chiossone, L., Dumas, P.-Y., Vienne, M., and Vivier, E. (2018). Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 18, 671–688.
<https://doi.org/10.1038/s41577-018-0061-z>.

Ciudad, M. (2018). ÉTUDE DES CELLULES LYMPHOÏDES INNÉES SPLÉNIQUES HUMAINES ET DE LEURS IMPLICATIONS AU COURS DE LA THROMBOPÉNIE IMMUNOLOGIQUE. 131. .

Constantinides, M.G., McDonald, B.D., Verhoef, P.A., and Bendelac, A. (2014a). A committed precursor to innate lymphoid cells. *Nature* 508, 397–401.
<https://doi.org/10.1038/nature13047>.

Conti, H.R., and Gaffen, S.L. (2015). IL-17-Mediated Immunity to the Opportunistic Fungal Pathogen *Candida albicans*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 195, 780–788.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500909>.

Cording, S., Medvedovic, J., Cherrier, M., and Eberl, G. (2014). Development and regulation of ROR γ (+) innate lymphoid cells. *FEBS Lett.* 588, 4176–4181.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.03.034>.

Cording, S., Medvedovic, J., Aychek, T., and Eberl, G. (2016). Innate lymphoid cells in defense, immunopathology and immunotherapy. *Nat. Immunol.* 17, 755–757.
<https://doi.org/10.1038/ni.3448>.

Crinier, A., Viant, C., Girard-Madoux, M., and Vivier, É. (2017a). Les cellules lymphoïdes innées. *médecine/sciences* 33, 534–542. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173305018>.

Cypowyj, S., and Vivier, É. (2016). Les cellules innées lymphoïdes : des nouveaux acteurs de l'immunité. *Bull. Académie Natl. Médecine* 200, 561–574. [https://doi.org/10.1016/S0001-4079\(19\)30732-0](https://doi.org/10.1016/S0001-4079(19)30732-0).

D

de Pauw, B.E. (2011). What Are Fungal Infections? *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 3, e2011001. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2011.001>.

Diefenbach, A. (2013). Innate lymphoid cells in the defense against infections. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* 3, 143–151. <https://doi.org/10.1556/EuJMI.3.2013.3.1>.

Domingues, R.G., and Hepworth, M.R. (2020). Immunoregulatory Sensory Circuits in Group 3 Innate Lymphoid Cell (ILC3) Function and Tissue Homeostasis. *Front. Immunol.* 11, 116.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00116>.

Dutton, E.E., Camelo, A., Sleeman, M., Herbst, R., Carlesso, G., Belz, G.T., and Withers, D.R. (2017). Characterisation of innate lymphoid cell populations at different sites in mice with defective T cell immunity. *Wellcome Open Res.* 2, 117.
<https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.13199.3>.

E

Chapitre 5. Références bibliographiques

Eberl, G. (2017). ROR γ t, a multitask nuclear receptor at mucosal surfaces. *Mucosal Immunol.* 10, 27–34. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.86>.

Eberl, G., Colonna, M., Di Santo, J.P., and McKenzie, A.N.J. (2015). Innate lymphoid cells. *Innate lymphoid cells: a new paradigm in immunology.* *Science* 348, aaa6566. <https://doi.org/10.1126/science.aaa6566>.

Elemam, N.M., Hannawi, S., and Maghazachi, A.A. (2017). Innate Lymphoid Cells (ILCs) as Mediators of Inflammation, Release of Cytokines and Lytic Molecules. *Toxins* 9, E398. <https://doi.org/10.3390/toxins9120398>.

F

Fan, J., Lv, Z., Yang, G., Liao, T.T., Xu, J., Wu, F., Huang, Q., Guo, M., Hu, G., Zhou, M., et al. (2018). Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptors: Critical Roles in Tumorigenesis. *Front. Immunol.* 9, 1187. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01187>.

Fauber, B.P., and Magnuson, S. (2014). Modulators of the nuclear receptor retinoic acid receptor-related orphan receptor- γ (ROR γ or RORc). *J. Med. Chem.* 57, 5871–5892. <https://doi.org/10.1021/jm401901d>.

Feng, S., Xu, S., Wen, Z., and Zhu, Y. (2015). Retinoic acid-related orphan receptor ROR β , circadian rhythm abnormalities and tumorigenesis (Review). *Int. J. Mol. Med.* 35, 1493–1500. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2155>.

G

Garibyan, L., and Avashia, N. (2013). Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *J. Invest. Dermatol.* 133, e6. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>.

Ghannam, M.G., and Varacallo, M. (2022a). *Biochemistry, Polymerase Chain Reaction.* In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.

Gladiator, A., Wangler, N., Trautwein-Weidner, K., and LeibundGut-Landmann, S. (2013). Cutting edge: IL-17-secreting innate lymphoid cells are essential for host defense against fungal infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 190, 521–525. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202924>.

Golebski, K., Ros, X.R., Nagasawa, M., van Tol, S., Heesters, B.A., Aglmous, H., Kradofer, C.M.A., Shikhagaie, M.M., Seys, S., Hellings, P.W., et al. (2019). IL-1 β , IL-23, and TGF- β

Gronke, K., Kofoed-Nielsen, M., and Diefenbach, A. (2016). Innate lymphoid cells, precursors and plasticity. *Immunol. Lett.* 179, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2016.07.004>.

H

Hazenberg, M.D., and Spits, H. (2014a). Human innate lymphoid cells. *Blood* 124, 700–709. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-11-427781>.

Huang, Y., Guo, L., Qiu, J., Chen, X., Hu-Li, J., Siebenlist, U., Williamson, P.R., Urban, J.F., and Paul, W.E. (2015). IL-25-responsive, lineage-negative KLRG1hi cells are multipotential 'inflammatory' type 2 innate lymphoid cells. *Nat. Immunol.* 16, 161–169. <https://doi.org/10.1038/ni.3078>.

J

Chapitre 5. Références bibliographiques

Janbon, G., Quintin, J., Lanternier, F., and d'Enfert, C. (2019). Studying fungal pathogens of humans and fungal infections: fungal diversity and diversity of approaches. *Microbes Infect.* 21, 237–245. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2019.06.011>.

Jarade, A., Di Santo, J.P., and Serafini, N. (2021). Group 3 innate lymphoid cells mediate host defense against attaching and effacing pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* 63, 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.06.005>.

Jetten, A.M. (2009). Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl. Recept. Signal.* 7, e003. <https://doi.org/10.1621/nrs.07003>.

Juelke, K., and Romagnani, C. (2016). Differentiation of human innate lymphoid cells (ILCs). *Curr. Opin. Immunol.* 38, 75–85. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.11.005>.

K

Kauffman, C.A. (2009). Fungal Infections. In *Infectious Disease in the Aging: A Clinical Handbook*, D. Norman, and T. Yoshikawa, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 347–366.

Killig, M., Glatzer, T., and Romagnani, C. (2014). Recognition Strategies of Group 3 Innate Lymphoid Cells. *Front. Immunol.* 5, 142. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00142>.

Klancnik, A., Kovac, M., Toplak, N., Piskernik, S., and Jersek, B. (2012). PCR in Food Analysis (IntechOpen).

Kohn, L.A., Hao, Q.-L., Sasidharan, R., Parekh, C., Ge, S., Zhu, Y., Mikkola, H.K.A., and Crooks, G.M. (2012). Lymphoid priming in human bone marrow begins before expression of CD10 with upregulation of L-selectin. *Nat. Immunol.* 13, 963–971. <https://doi.org/10.1038/ni.2405>.

Korchagina, A.A., Koroleva, E., and Tumanov, A.V. (2021a). Innate Lymphoid Cells in Response to Intracellular Pathogens: Protection Versus Immunopathology. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11, 775554. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.775554>.

Kotas, M.E., and Locksley, R.M. (2018a). Why ILCs? *Immunity* 48, 1081–1090. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.06.002>.

Kumar, R., Theiss, A.L., and Venuprasad, K. (2021). RORyt protein modifications and IL-17-mediated inflammation. *Trends Immunol.* 42, 1037–1050. <https://doi.org/10.1016/j.it.2021.09.005>.

L

Lorenz, T.C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *J. Vis. Exp. JoVE* 3998. <https://doi.org/10.3791/3998>.

M

Matsumoto, A., Kanai, T., Mikami, Y., Chu, P.-S., Nakamoto, N., Ebinuma, H., Saito, H., Sato, T., Yagita, H., and Hibi, T. (2013). IL-22-Producing RORyt-Dependent Innate Lymphoid Cells Play a Novel Protective Role in Murine Acute Hepatitis. *PLOS ONE* 8, e62853. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062853>.

Mengesha, B.G., and Conti, H.R. (2017a). The Role of IL-17 in Protection against Mucosal Candida Infections. *J. Fungi* 3, 52. <https://doi.org/10.3390/jof3040052>.

Miljković, Đ., Jevtić, B., Stojanović, I., and Dimitrijević, M. (2021). ILC3, a Central Innate Immune Component of the Gut-Brain Axis in Multiple Sclerosis. *Front. Immunol.* 12. .

Chapitre 5. Références bibliographiques

Mjösberg, J.M., Trifari, S., Crellin, N.K., Peters, C.P., van Drunen, C.M., Piet, B., Fokkens, W.J., Cupedo, T., and Spits, H. (2011). Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CCR4 and CD161. *Nat. Immunol.* *12*, 1055–1062. <https://doi.org/10.1038/ni.2104>.

Montaldo, E., Teixeira-Alves, L.G., Glatzer, T., Durek, P., Stervbo, U., Hamann, W., Babic, M., Paclik, D., Stölzel, K., Gröne, J., et al. (2014). Human RORγt(+)CD34(+) cells are lineage-specified progenitors of group 3 RORγt(+) innate lymphoid cells. *Immunity* *41*, 988–1000. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.11.010>.

Montaldo, E., Juelke, K., and Romagnani, C. (2015). Group 3 innate lymphoid cells (ILC3s): Origin, differentiation, and plasticity in humans and mice. *Eur. J. Immunol.* *45*, 2171–2182. <https://doi.org/10.1002/eji.201545598>.

Mortha, A., and Burrows, K. (2018). Cytokine Networks between Innate Lymphoid Cells and Myeloid Cells. *Front. Immunol.* *9*, 191. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00191>.

Mutlu, A.G. (2012). Measuring of DNA Damage by Quantitative PCR (IntechOpen).

N

N, S., Ca, V., and Jp, D.S. (2015). Transcriptional regulation of innate lymphoid cell fate. *Nat. Rev. Immunol.* *15*. <https://doi.org/10.1038/nri3855>.

Nabekura, T., and Shibuya, A. (2021). Type 1 innate lymphoid cells: Soldiers at the front line of immunity. *Biomed. J.* *44*, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.10.001>.

P

Peters, C.P., Mjösberg, J.M., Bernink, J.H., and Spits, H. (2016). Innate lymphoid cells in inflammatory bowel diseases. *Immunol. Lett.* *172*, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.10.004>.

R

Ratajewski, M., Walczak-Drzewiecka, A., Sałkowska, A., and Dastyk, J. (2012). Upstream Stimulating Factors Regulate the Expression of RORγT in Human Lymphocytes. *J. Immunol.* *189*, 3034–3042. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200519>.

Rethacker, L. (2021a). Les cellules lymphocytaires innées dans l'immunosurveillance des tumeurs métastatiques. phdthesis. Université Paris Cité.

Romani, L. (2011a). Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 275–288. <https://doi.org/10.1038/nri2939>.

Ruiz-Sánchez, B.P., Cruz-Zárate, D., Estrada-García, I., and Wong-Baeza, I. (2017). Las células linfoides innatas y su papel en la regulación de la respuesta inmune. *Rev. Alerg. México* *64*, 347–363. <https://doi.org/10.29262/ram.v64i3.284>.

Rutz, S., Eidenschenk, C., Kiefer, J.R., and Ouyang, W. (2016a). Post-translational regulation of RORγt-A therapeutic target for the modulation of interleukin-17-mediated responses in autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* *30*, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2016.07.004>.

S

Sawada, Y., Setoyama, A., Sakuragi, Y., Saito-Sasaki, N., Yoshioka, H., and Nakamura, M. (2021a). The Role of IL-17-Producing Cells in Cutaneous Fungal Infections. *Int. J. Mol. Sci.* *22*, 5794. <https://doi.org/10.3390/ijms22115794>.

Chapitre 5. Références bibliographiques

Schulz-Kuhnt, A., Wirtz, S., Neurath, M.F., and Atreya, I. (2020). Regulation of Human Innate Lymphoid Cells in the Context of Mucosal Inflammation. *Front. Immunol.* 11, 1062. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01062>.

Sciumè, G., Shih, H.-Y., Mikami, Y., and O'Shea, J.J. (2017). Epigenomic Views of Innate Lymphoid Cells. *Front. Immunol.* 8, 1579. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01579>.

Serafini, N., Vosshenrich, C.A.J., and Di Santo, J.P. (2015). Transcriptional regulation of innate lymphoid cell fate. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 415–428. <https://doi.org/10.1038/nri3855>.

Shahi, S., Zununi Vahed, S., Fathi, N., and Sharifi, S. (2018). Polymerase chain reaction (PCR)-based methods: Promising molecular tools in dentistry. *Int. J. Biol. Macromol.* 117, 983–992. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.085>.

Solanki, G. (2012). Polymerase Chain Reaction. *Int. J. Pharmacol. Res.* 2, 98–102. <https://doi.org/10.7439/ijpr.v2i3.514>.

Spits, H., and Cupedo, T. (2012). Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 647–675. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075053>.

Spits, H., and Di Santo, J.P. (2011). The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat. Immunol.* 12, 21–27. <https://doi.org/10.1038/ni.1962>.

Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., et al. (2013). Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 145–149. <https://doi.org/10.1038/nri3365>.

Stehle, C., Hernández, D.C., and Romagnani, C. (2018a). Innate lymphoid cells in lung infection and immunity. *Immunol. Rev.* 286, 102–119. <https://doi.org/10.1111/imr.12712>.

T

Teunissen, M.B.M., Munneke, J.M., Bernink, J.H., Spuls, P.I., Res, P.C.M., Te Velde, A., Cheuk, S., Brouwer, M.W.D., Menting, S.P., Eidsmo, L., et al. (2014). Composition of innate lymphoid cell subsets in the human skin: enrichment of NCR(+) ILC3 in lesional skin and blood of psoriasis patients. *J. Invest. Dermatol.* 134, 2351–2360. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.146>.

U

Uhel, F., and Zafrani, L. (2019). Nouvelles techniques de biologie moléculaire. *Médecine Intensive Réanimation* 28, 464–472. <https://doi.org/10.3166/rea-2019-0119>.

V

van de Pavert, S.A., and Mebius, R.E. (2010). New insights into the development of lymphoid tissues. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 664–674. <https://doi.org/10.1038/nri2832>.

van de Pavert, S.A., and Vivier, E. (2016). Differentiation and function of group 3 innate lymphoid cells, from embryo to adult. *Int. Immunol.* 28, 35–42. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxv052>.

Vivier, E., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., et al. (2018). Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell* 174, 1054–1066. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.017>.

Chapitre 5. Références bibliographiques

Vonarbourg, C., Mortha, A., Bui, V.L., Hernandez, P.P., Kiss, E.A., Hoyler, T., Flach, M., Bengsch, B., Thimme, R., Hölscher, C., et al. (2010a). Regulated expression of nuclear receptor ROR γ t confers distinct functional fates to NK cell receptor-expressing ROR γ t(+) innate lymphocytes. *Immunity* 33, 736–751. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.017>.

W

Welch, H.M. (2012). The Polymerase Chain Reaction. In *Metastasis Research Protocols*, M. Dwek, S.A. Brooks, and U. Schumacher, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 71–88.

Withers, D.R., and Hepworth, M.R. (2017). Group 3 Innate Lymphoid Cells: Communications Hubs of the Intestinal Immune System. *Front. Immunol.* 8. .

Y

Yilmaz, A., Onen, H.I., Alp, E., and Menevse, S. (2012). Real-Time PCR for Gene Expression Analysis (IntechOpen).

Z

Zhang, Y., Luo, X., Wu, D., and Xu, Y. (2015). ROR nuclear receptors: structures, related diseases, and drug discovery. *Acta Pharmacol. Sin.* 36, 71–87. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.120>.

Zheng, M., and Zhu, J. (2022). Innate Lymphoid Cells and Intestinal Inflammatory Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 1856. <https://doi.org/10.3390/ijms23031856>.