



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID-TLEMCEM



Faculté de Science de la Nature et de la Vie et Science de la Terre et l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliqué et de l'Immunologie W04144100

MEMOIRE

Présenté par

Derrar Chahinez

Fetih Yamina Nour El Houda

En vue de l'option du

Diplôme de MASTER

En Immunologie

Thème :

Conception des amorces du gène *TBX21* exprimé par les ILCs1 et NKp46+ILCs3 au cours de l'infection par *Pseudomonas aeruginosa*

Soutenu le 12-06-2024, devant le jury composé de :

Présidente	ELMEZOUAR Chahrazed	MCB	Université de Tlemcen
Encadrante	NOUARI Wafa	MCB	Université de Tlemcen
Examinatrice	MILIANI Maroua	MCB	Université de Tlemcen

Année Universitaire 2023/2024

Résumé

Introduction : *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) est une bactérie pathogène à Gram négatif, non sporulée, aérobic et capable de provoquer plusieurs infections chez les personnes immunodéprimées. Les réponses immunitaires innées de l'hôte contre cette bactérie nécessitent l'intervention de nombreuses cellules immunitaires y compris les cellules lymphoïdes innées (ILCs), qui sont une population cellulaire qui répond rapidement aux signaux provenant des tissus infectés ou endommagés et génère un ensemble de cytokines qui régulent le développement des réponses antibactériennes. La diversité des populations des ILCs est sous le contrôle de multiples facteurs de transcription tels que T-bet, qui contrôle le développement et la maturation fonctionnelle des ILCs1 et des NKp46+ILCs3.

Objectifs : Concevoir des séquences d'oligonucléotides encadrant une partie du gène *TBX21* exprimé par les ILCs1 et les NKp46+ILCs3 au cours de l'infection par *P. aeruginosa*.

Matériel et méthodes : Dans ce travail, la base de données « Ensemble » a été utilisée afin d'obtenir la séquence génomique spécifique du gène *TBX21*. Ensuite, l'outil Primer-Blast du site « www.ncbi.nih.gov » a été utilisé pour élaborer les amorces spécifiques nécessaires à l'amplification de ce gène par PCR. Et enfin, la vérification de la fiabilité des paires d'amorces sélectionnées a été faite par l'outil PCR *in silico*.

Résultats : L'utilisation de l'outil Primer-BLAST nous a permis d'obtenir trois paires d'amorces répondant à tous les critères de choix de bonnes amorces.

Conclusion : En conclusion, les amorces choisies peuvent être utilisées pour l'étude de l'expression du gène *TBX21* dans diverses études ultérieures.

Mots clés : Amorce, *TBX21*, ILCs1, NKp46+ILCs3, Primer-BLAST, *Pseudomonas aeruginosa*.

Abstract

Introduction: *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) is a Gram-negative, non-spore-forming, aerobic, pathogenic bacterium capable of causing multiple infections in immunocompromised individuals. The host's innate immune responses against this bacterium require the intervention of numerous immune cells, including innate lymphoid cells (ILCs), which are a cell population that responds rapidly to signals from infected or damaged tissue and generates a set of cytokines that regulate the development of antibacterial responses. The diversity of ILC populations is under the control of multiple transcription factors such as T-bet, which controls the development and functional maturation of ILCs1 and NKp46+ILCs3.

Objectives: Design oligonucleotide sequences framing a part of the *TBX21* gene expressed by ILCs1 and NKp46+ILCs3 during bacterial infection by *Pseudomonas aeruginosa*.

Material and methods: In this work, the “Ensemble” database was used to obtain the specific genomic sequence of the *TBX21* gene. Next, the Primer-Blast tool from the “www.ncbi.nih.gov” website was used to develop the specific primers required for PCR amplification of this gene. Finally, the reliability of the selected primer pairs was verified using the in silico PCR tool.

Results: Using the Primer-BLAST tool, we obtained three pairs of primers meeting all the criteria for choosing good primers.

Conclusion: In conclusion, the chosen primers can be used for the study of the expression of the *TBX21* gene in various subsequent studies.

Key words: Primer, *TBX21 Gene*, ILC1, NKp46+ILCs3, Primer-BLAST, PCR, *Pseudomonas aeruginosa*.

المخلص

المقدمة: *Pseudomonas aeruginosa* هي بكتيريا ممرضة، سلبية الجرام، غير قابلة للأبواغ، هوائية وقادرة على التسبب في العديد من حالات العدوى عند الأشخاص الذين يعانون من ضعف المناعة. الاستجابات المناعية الفطرية للإنسان ضد هذه البكتيريا تتطلب تدخل العديد من الخلايا مثل الخلايا اللمفاوية الفطرية (ILCs) التي تستجيب بسرعة للإشارات القادمة من الأنسجة المصابة بعدوى أو التالفة فتنتج مجموعة من السيتوكينات التي تنظم تطور استجابة مناعية ضد البكتيريا. يكون تنوع مجموعات الخلايا اللمفاوية الفطرية تحت تحكم العديد من عوامل الاستنساخ مثل T-bet الذي يتحكم في التطور والنضج الوظيفي للخلايا ILCs1 وNKp46+ILCs3.

الهدف: تصميم تسلسل قليل النيكليوتيد يحيط بجزء من الجين *TBX21* معبر عنه بواسطة الخلايا ILCs1 وNKp46+ILCs3 خلال عدوى بكتيرية سببها *Pseudomonas aeruginosa*.

المواد والطرق: في هذا العمل، تم استعمال قاعدة البيانات «Ensemble» للوصول الى التسلسل الجيني للجين *TBX21* والأداة Primer-Blast في الموقع «www.ncbi.nlm.nih.gov» لتصميم البادئات الخاصة الضرورية لمضاعفة هذا الجين ب PCR. التأكد من فعالية البادئات المختارة يتم من خلال الأداة In silico PCR.

النتيجة: استعمال الأداة PRIMER-BLAST سمح لنا بالحصول على ثلاثة أزواج من البادئات التي تستجيب لكل خصائص الاختيار الجيد للبادئات.

الخاتمة: يمكن استخدام البادئات التي تم الحصول عليها لدراسة الجين *TBX21* في دراسات الحقنة مختلفة.

الكلمات المفتاحية: بادئة، الجين *TBX21*، ILCs1، ILCs3، NKp46، PCR، PRIMER-BLAST، *Pseudomonas aeruginosa*

AVANT-PROPOS

Tout d'abord, nous remercions Allah de nous avoir donné la force, le courage, la volonté et de nous avoir aidé à aller jusqu'au bout de nos études.

Nous serons heureux de remercier **Pr Mourad ARIBI**, Directeur du Laboratoire Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie (BIOMOLIM) à l'Université de Tlemcen.

Nous adressons nos sincères remerciements à notre encadrante, **Dr. NOUARI Wafa**, maître de conférences de classe B au département de Biologie- Université de Tlemcen, car elle nous a apporté tout le soutien dans notre parcours académique et nous a donné toutes les informations, les conseils et l'orientation pour mener à bien cette recherche.

Nous tenons à remercier les membres du jury, d'avoir accepté d'évaluer ce travail et de partager avec nous ce moment important de notre parcours académique.

Nos vifs remerciements à tous nos enseignants pour leurs soutiens et leurs conseils durant nos cursus universitaires.

Nous tenons aussi à remercier toute l'équipe du Laboratoire BIOMOLIM et toute la promotion MASTER 2 immunologie 2023/2024.

J'offre toute ma gratitude à Adda Abdullah, qui m'a aidé, motivé et soutenu dans les moments difficiles. Je remercie également sa mère, Mme Tabtab Jawaida, son père, Tabtab Youssef, ainsi que ses sœurs et frères.

Mes vifs remerciements vont à mes parents, mes frères, mes copines et tout ma famille qui m'ont toujours aidé et soutenu.

Je dédie ce travail à mes parents, à Mr Abdelilah et mes frères qui m'ont soutenu et cru jusqu'au bout ainsi à tous les membres de ma famille qui ont su me soulager avec les mots qu'il faut.

Enfin, à ma chère grand-mère, qui aurait aimé être là pour me voir réaliser son rêve.

Nour El Houda

Je dédie ce modeste travail à ma chère maman « Mous Hakima » qui a toujours été ma porte d'encouragement, merci pour ton amour inconditionnel.

À mon père « Derrar Omar » qui a été une source de soutien et sans lui, je ne serai pas celle que je suis aujourd'hui.

À mon frère, sœur et toutes mes copines qui ont été nos piliers dans les moments difficiles et nos partenaires de fête dans les moments de joie.

Enfin, à mes chers grands-pères et grands-mères qui auraient aimé être ici aujourd'hui et me voir réaliser leurs rêves.

Chahinez

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
Abstract	iv
Résumé en Arabe	v
Avant-propos	vi
Table des matières	vii
Liste des Figures	x
Liste des Tableaux	xii
Liste des abréviations	xiii
Introduction	1
Chapitre 1. Revue de la littérature	3
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Erreur ! Signet non défini.
1.1.1. Généralités	Erreur ! Signet non défini.
1.1.2. Facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i>	Erreur ! Signet non défini.
1.1.2.1. Flagelle	Erreur ! Signet non défini.
1.1.2.2. Pili ou fimbriae	Erreur ! Signet non défini.
1.1.2.3. Lipopolysaccharide	Erreur ! Signet non défini.
1.1.2.4. Biofilm	6
1.1.2.5. Facteurs sécrétés	7
1.1.2.5.1. Exotoxine A	7
1.1.2.5.2. Enzymes protéolytiques.....	Erreur ! Signet non défini.
1.1.2.5.3. Pyocyanine	8
1.1.4. Aspect épidémiologique.....	8
1.1.5. Résistance de <i>P. aeruginosa</i>	Erreur ! Signet non défini.
1.1.5.1. Résistance intrinsèque.....	9
1.1.5.2. Résistance acquise.....	9
1.1.5.3. Résistance adaptative.....	9
1.2. Les cellules lymphoïdes innées.....	9
1.2.1. Historique	9
1.2.2. Développement et localisation	10
1.2.3. Sous populations	Erreur ! Signet non défini.
1.2.3.1. ILC de type 1.....	Erreur ! Signet non défini.
1.2.3.2. ILC de type 2.....	Erreur ! Signet non défini.
1.2.3.3. ILCs de type 3.....	Erreur ! Signet non défini.
1.2.3.4. ILC reg	Erreur ! Signet non défini.
1.2.4. Plasticité.....	Erreur ! Signet non défini.

1.2.4.1. Plasticité NK/ILC1	Erreur ! Signet non défini.
1.2.4.2 Plasticité ILC3/NK	Erreur ! Signet non défini.
1.2.4.3 Plasticité ILC1/ILC2.....	Erreur ! Signet non défini.
1.2.4.4 Plasticité ILC1/ILC3.....	Erreur ! Signet non défini.
1.2.4.5 Plasticité ILC2/ILC3.....	Erreur ! Signet non défini.
1.2.4.6 Plasticité ILC3 NCR-/ILC3 NCR+	Erreur ! Signet non défini.
1.2.4.7 Plasticité iILC2/nILC2.....	Erreur ! Signet non défini.
1.2.5. Fonctions des ILCs.....	Erreur ! Signet non défini.
1.2.5.1. Rôle des ILC1s	19
1.2.5.2. Rôle des ILC2s	20
1.2.5.3. Rôle des ILC3s	Erreur ! Signet non défini.
1.3. Facteur de transcription T-bet	Erreur ! Signet non défini.
1.3.1. Famille T-Box	Erreur ! Signet non défini.
1.3.2. Gène TBX21.....	Erreur ! Signet non défini.
1.3.3. Structure de T-bet.....	Erreur ! Signet non défini.
1.3.4. Expression de T-bet	Erreur ! Signet non défini.
1.3.4.1. Par la voie IFN- γ R/ STAT1 et BCR	Erreur ! Signet non défini.
1.3.4.2 Par la voie IFN- γ R/STAT1 et TCR.....	Erreur ! Signet non défini.
1.3.4.3. Par la voie IL-12R/STAT4	Erreur ! Signet non défini.
1.3.4.5. Par la voie TLR / MyD88	Erreur ! Signet non défini.
1.3.4.6. Par la voie de signalisation mTOR	Erreur ! Signet non défini.
1.3.5. Fonctions de T-bet.....	Erreur ! Signet non défini.
1.3.5.1. Dans l'immunité adaptative	Erreur ! Signet non défini.
1.3.5.2. Dans les cellules non conventionnelles	Erreur ! Signet non défini.
1.3.5.3. Dans l'immunité innée	Erreur ! Signet non défini.
1.3.6. T-bet dans les ILCs	Erreur ! Signet non défini.
1.4. PCR.....	Erreur ! Signet non défini.
1.4.1. Historique	Erreur ! Signet non défini.
1.4.2. Définition	Erreur ! Signet non défini.
1.4.3. Principe	Erreur ! Signet non défini.
1.4.4. Matériel	Erreur ! Signet non défini.
1.4.5. Procédure.....	Erreur ! Signet non défini.
1.4.5.1. Dénaturation	Erreur ! Signet non défini.
1.4.5.2. Hybridation ou anelage	Erreur ! Signet non défini.
1.4.5.3. Extension, élongation ou amplification	Erreur ! Signet non défini.
1.4.6. Types de PCR.....	Erreur ! Signet non défini.

1.4.6.1. PCR en temps réel.....	Erreur ! Signet non défini.
1.4.6.2. PCR par transcriptase inverse-polymérase	Erreur ! Signet non défini.
1.4.6.3. La PCR multiplex	Erreur ! Signet non défini.
1.5. Problématique et objectif.....	32
1.5.1. Problématique	32
1.5.2. Objective	33
1.5.3. But.....	33
Chapitre 2. Matériel et méthodes.....	34
2.1. Conception des amorces	34
2.2. Conception des amorces pour amplifier le gène <i>TBX21</i>	35
2.2.1. Détermination de la séquence du gène <i>TBX21</i>	35
2.2.2. Le design des Primers : L'outil Primer-BLAST	38
2.2.3. Confirmation des résultats par <i>In-Silico</i> PCR.....	40
Chapitre 3. Résultats.....	42
3.1. Résultats de la conception des amorces.....	42
3.1.1. Résultats du Primer-BLAST.....	42
3.1.2. Résultats d' <i>in-silico</i> PCR	45
Chapitre 4. Conclusion et perspectives	48
Chapitre 5. Bibliographie	49

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Structure du LPS.	5
Figure.1.2. Structure chimique du lipide A de <i>P. aeruginosa</i> .	5
Figure 1.3. Cycle de développement du biofilm de <i>P. aeruginosa</i>	7
Figure 1.4. Développement des cellules lymphoïdes innées	12
Figure 1.5. Sous population ILC de type 1	13
Figure 1.6. Sous population ILC de type 2	15
Figure 1.7. Sous population ILC de type 3	16
Figure 1.8. Plasticité des ILCs	19
Figure.1.9. Structure cristalline du domaine de liaison à l'ADN Tbox et localisation du facteur de transcription T-bet	23
Figure1.10. Expression de T-bet	25
Figure.1.11. Fonction de T-bet	28
Figure.1.12. Procédure PCR	32
Figure2.1. Plateforme de la base de données Ensembl	36
Figure 2.2. Résultats de la recherche du gène TBX21	37
Figure 2.3. Les caractéristiques du gèneTBX21.	37
Figure2.4. La séquence du gèneTBX21 par la plateforme « Ensembl ».	38
Figure2.5. La séquence d'intérêt	38
Figure.2.6. Le site NCBI	39
Figure.2.7. L'outil PRIMER-BLAST	39
Figure.2.8. L'outil PRIMER-BLAST	40
Figure.2.9. Paramètres de vérification de la spécificité des paires d'amorces (Primer Pair Specificity Checking Parameters	40
Figure.2.10. Recherche d'amorces spécifiques à votre modèle PCR « Finding primers specific to your PCR template ».	41
Figure 2.11. Plateforme du site « genome.ucsc.edu ». Confirmation des résultats par la plateforme « UCSC genome browser ».	41
Figure2.12. Le site In-Silico PCR	41
Figure 3.1. Résultats du Primer-BLAST	43
Figure 3.2. Primer pair 3.	43
Figure3.3. Primer pair 4.	43
Figure3.4. Primer paire 5.	43
Figure 3.5. Résultat de PRIMER-BLAST.	45
Figure 3.6. Les amorces encadrant la région d'intérêt.	45
Figure 3.7. Confirmation des résultats sur la plateforme « UCSC genome browser	45
Figure 3.8. Résultats de la confirmation de la troisième paire d'amorce	46

Figure 3.9. Résultats de la confirmation de la quatrième paire d'amorce	46
Figure 3.10. Résultats de la confirmation de la cinquième paire d'amorce	47

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1. La comparaison entre les critères d'une bonne amorce et nos amorce.....44

LISTE DES ABREVIATIONS

2B4 + : récepteur.

A

A : Adénine

ADNdb : ADN double brin

ADNsb : ADN simple brin

ADNc : ADN complémentaire (complementary DNA)

AKT : protéine kinase B

ALP : progéniteur entièrement lymphoïde (all lymphoid progenitors).

B

BCR : récepteur de cellule B (BCR, B cell receptor)

C

CCR6 : Récepteur 6 de chimiokine motif C-C (C-C Motif Chemokine Receptor 6).

cdPCR : PCR numérique sur puce

CHILP : progéniteurs ILC de type assistant commun (common helper-like ILC progenitors).

CLP : progéniteurs lymphoïdes communs (common lymphoid progenitor).

CSH : Les cellules souches hématopoïétiques (Hematopoietic stem cells).

CXCR5 : C-X-C chemokine receptor type 5

CXCR6 : récepteur 6 de chimiokine à motif C-X-C (C-X-C motif chemokine receptor 6).

C : Cytosine.

D

ddPCR : PCR numérique basée sur des gouttelettes

DC : les cellules dendritiques conventionnelles (conventional dendritic cell)

DLL1: Delta Like Canonical Notch Ligand 1.

dNTP : les désoxynucléotides 5' triphosphates (deoxynucleotide triphosphate)

d-Rha : d-rhamnose.

E

Egr2: Early growth response protein 2.

EILP : progéniteurs précoces ILC (EILP, early ILC progenitors).

ENaC : Canal sodique épithélial.

Eomes : Eomesodermine

EPS : Substances polymères extracellulaires.

ETS1 : le virus de l'érythroblastose aviaire E26 (avian erythroblastosis virus E26 homologue-1).

G

GAS : séquence activé MyD88 par l'IFN- γ (GAS, IFN- γ activated site)

GATA3 : protéine de liaison GATA 3(GATA binding protein 3).

G : Guanine.

H

HCl : acide chlorhydrique

H₂O₂: peroxide d'hydrogène

I

Id1: Inhibitor of Differentiation 1.

Id2 : inhibiteur de la liaison à l'ADN2 (inhibitor of DNA binding 2).

Id3: Inhibitor of Differentiation 3.

iILC2: ILC2 inflammatoire (iILC2, inflammatory ILC2)

IL : l'interleukine (Interleukin).

ILC : Cellules lymphocytaires innées (innate lymphoid cell).

ILC reg : ILC régulateur

ILCP : précurseurs des cellules lymphoïdes innées (innate lymphoid cell precursor).

INF : l'interféron de type (Interferon).

L

LB : des lymphocytes B (LB, B lymphocyte)

LPS : lipopolysaccharide.

LTh1 : lymphocytes T auxiliaires 1 (Th1, T helper1)

LTi : inducteurs des tissus lymphoïdes.

Ly6C: lymphocyte antigen 6 family member C.

Ly6D : l'antigène lymphocytaire LY6, membre de la famille D (lymphocyte antigen 6 family member D).

M

MgCl₂ : Chlorure de magnésium

MO : Membrane externe (outer membrane)

mTOR : La cible mammifère de la rapamycine (mTOR, The mammalian target of rapamycin)

MyD88 : facteur de différenciation myéloïde 88 (MyD88, myeloid differentiation factor 88)

N

[(NH₄)₂SO₄] : sulfate d'ammonium

NCR : récepteur naturels de cytotoxicité.

Nfil3 : facteur nucléaire IL-3 induit (Nfil3, nuclear factor IL-3 induced).

nILC2 : ILC2 homéostatiques ou naturel (nILC2, homeostatic or natural ILC2)

NK : Cellules natural killer.

NKc : Conventional natural killer.

NKP : progéniteurs pré-NK (natural killer progenitors).

O

OPS : O-polysaccharide.

P

PCR : la réaction en chaîne par polymérase (polymerase chain reaction)

Pd-1 : le marqueur de la mort cellulaire programmée de surface cellulaire (programmed cell death 1).

PDK1 : phosphoinositide dépendent kinase 1

PI3K : phosphoinositide 3 kinase

PLZF : facteurs de transcription doigt de zinc de la leucémie promyélocytaire (codé par le Zbtb16).

R

RT-PCR : La réaction en chaîne par transcriptase inverse-polymérase (reverse transcriptase ou encore RT)

Raptor : la protéine associée à la régulation de mTOR (Raptor, regulatory-associated protein of mTOR)

Rictor : le compagnon insensible à la rapamycine de mTOR (Rictor, rapamycin-insensitive companion of mTOR)

Rorc : récepteur orphelin C lié au RAR (Rorc, RAR Related Orphan Receptor C)

ROR γ t : Récepteur gamma orphelin lié aux récepteurs d'acide rétinoïque.

ROS : reactive oxygen species

Runx3 : facteur de transcription 3 lié à l'avorton (runt-related transcription factor 3).

S

SIE, c-sis-inducible elements

SNP : polymorphisme mononucléotidique.

STAT : facteur de transcription transducteur de signal et activateur de transcription (signal transducer and activator of transcription)

T

T-bet : T-box-expressed-in-T –cells.

TBR1 : protéine cérébrale 1 de la boîte T (TBR1, T-box brain protein 1)

TBX21 : protéine 21 de facteur de transcription T-box (TBX21, T-box transcription factor protein 21)

Tcf7 : Facteur de transcription 7 spécifique des lymphocytes T (Transcription factor 7 T cell specific).

TCR : récepteur des lymphocytes T (TCR, T cell receptor)

TGF- β : facteur de Croissance Transformant β (Transforming growth factor β)

Th1: Lymphocyte T helper de type 1.

Th17: Lymphocyte T helper de type 17.

Th2: Lymphocyte T helper de type 2.

Th22: Lymphocyte T helper de type 22.

Thy1: antigène 1 des thymocytes (Thymocyte antigen 1).

TLR: Toll like receptor

Tox : protéine de boîte de groupe à haute mobilité associée à la sélection des thymocytes (thymocyte selection-associated high mobility group box protein).

T : Thymine.

T_m : Température de fusion.

α LP : α précurseur lymphoïde (α LP, α -lymphoid precursor).

α 4 β 7 + : intégrine.

Introduction

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) est une bactérie ubiquitaire à Gram négatif qui peut provoquer un grand nombre des infections chronique et aiguës (Reynolds et Kollef 2021). Cette bactérie se caractérise par une grande capacité à former des biofilms qui la protègent des stress environnementaux environnants, empêchent la phagocytose et confèrent ainsi une aptitude de colonisation et de persistance élevées (Moradali, Ghods, et Rehm 2017). De plus, cet agent pathogène représente une résistance intrinsèque élevée aux antibiotiques ce qui lui permet de nuire aux cellules hôtes, de moduler les mécanismes immunitaires adaptatifs humains et de provoquer ainsi l'apparition de nouvelles infections (Qin et al. 2022).

L'immunité innée représente une première ligne de défense importante face aux infections bactériennes. Elle comprend plusieurs types de cellules, notamment les cellules lymphoïdes innées (ILC, *innate lymphoid cells*) qui représentent un sous-ensembles de lymphocytes innés récemment décrit comme une famille croissante de cellules effectrices résidentes dans les tissus périphériques et les barrières muqueuses (Kotas et Locksley 2018; Nagasawa, Spits, et Ros 2018). Les ILCs sont un groupe hétérogène des lymphocytes sans récepteurs antigéniques réarrangés des lymphocytes T (TCR, *T cell receptor*) ou des lymphocytes B (BCR, *B cell receptor*) et n'expriment pas de marqueurs de lignée (Lin -) (Artis et Spits 2015). Ce sont des cellules à longue durée de vie, auto-renouvelées, ont une plasticité remarquable et peuvent acquérir des mémoires immunologiques pour une surveillance immunitaire efficace (Tsymbala et Kuchler 2023). En se basant sur l'expression de facteurs de transcription et sur la production de diverses cytokines, les ILCs se divisent en trois populations (ILC1s, ILC2s et ILC3s) dont le développement de ces cellules est piloté par le facteur de transcription inhibiteur de la liaison à l'ADN (Id2, *Inhibitor of DNA binding*) (Tsymbala et Kuchler 2023; Constantinides et al. 2014). Les ILCs jouent un rôle important dans la défense immunitaire contre les microbes, la régulation de l'immunité adaptative, le remodelage tissulaire, ainsi que la réparation et l'homéostasie (Nagasawa, Spits, et Ros 2018).

La protéine T-box exprimée dans les cellules T (T-bet, *T-box protein expressed in T cells*) codé par le gène *Tbx21* (TBX21, *T-box transcription factor protein 21*) est un facteur de transcription essentiel pour l'engagement des lymphocytes T helper (Th) dans la lignée Th1 et l'activation de la transcription du gène *IFN- γ* . Cette protéine joue un rôle important dans les cellules immunitaires innées et adaptatives (Oh et Hwang 2014). Dans les ILCs, T-bet contrôle la plasticité des ROR γ t+ILC (ROR γ t, *Retinoid-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma t*), induit l'expression de l'interféron gamma (IFN γ , *gamma interferon*), réprime la production d'interleukine 17A (IL-17A, *interleukin 17A*) et empêche l'expression de

Introduction

récepteur de l'IL-7 (IL-7R, *interleukin 7 receptor*) (Lazarevic, Glimcher, et Lord 2013). T-bet régule également les programmes transcriptionnel nécessaires au développement des ILC1s ce qui leur permet de sécréter l'IFN- γ et de répondre aux agents pathogènes intracellulaires (Nabekura et Shibuya 2021).

L'étude de l'importance de l'expression du T-bet par les ILC1s impliqués dans l'élimination des infections bactérienne nécessite plusieurs outils de biologie moléculaire, notamment la réaction en chaîne par polymérase (PCR) qui est une technique d'amplification d'acide nucléique utilisée pour dénaturer et renaturer de courts segments de séquences d'acide désoxyribonucléique (ADN) à l'aide de l'enzyme ADN polymérase I, connu sous le nom d'ADN Taq (Lorenz 2012). La réalisation d'une PCR requiert plusieurs paramètres dont l'utilisation des amorces spécifiques constituent une étape clé dans sa réussite.

Dans ce sens, notre travail consiste à concevoir des amorces qui serviront à amplifier la séquence d'oligonucléotide encadrant l'exon 1 de gène *TBX21* exprimé par les ILC1s et NCR+ILC3s qui contribue à l'élimination des infections bactériennes, notamment celles qui sont causées par *P. aeruginosa*.

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) a été décrit pour la première fois par le pharmacien Français Carle Gessard en 1882. Cette bactérie en culture peut produire un certain nombre de pigments. Parmi ces pigments, Gessard décrivait la pyocyanine, un composé phénazine bleu, vert qui possède à la fois des propriétés antimicrobiennes et toxiques. Le nom *Pseudomonas* est devisé en deux mots grecs : Pseudo signifie « faux », monas signifie « unité unique » et *aeruginosa* « bleu verdâtre » provient du latin *aerūgō* qui signifie « cuivre rouillé » (Diggle et Whiteley 2020).

1.1.1. Généralités

P. aeruginosa est un bâtonnet à Gram négatif, aérobic et non sporulé, et mesure environ 1 à 5 µm de longueur et 0,5 à 1,0 µm de largeur (Kerr et Snelling 2009). En présence d'oxygène, cette bactérie utilise la voie glycolytique pour la dégradation du glucose. En revanche, dans des conditions anaérobies, elle utilise l'azote comme accepteur d'électrons (De Sousa et al. 2021). *P. aeruginosa* possède des pili et des flagelles qui sont importants pour sa motilité et sa virulence (Burrows 2012). Il pousse bien à 37 degré Celsius (°C), mais il est capable de survivre dans des températures allant de 4 à 42 °C (Stover et al. 2000).

Les premières études utilisant la phylogénie du génome principal de polymorphisme mononucléotidique (SNP, *single nucleotide polymorphism*) ont subdivisé les souches de *P. aeruginosa* en deux groupes, le premier groupe comprend la souche PAO1 et le deuxième groupe comprend la souche PA14 (Freschi et al. 2019). La séquence complète du génome de la souche *P. aeruginosa* de type PAO1 a été publiée par Stover et d'autres collaborateurs en 2000 (Stover et al. 2000). Cette souche se caractérise par un génome très vaste et complexe, d'environ 6,3 Mbp, codant pour 5 700 gènes, dont 5 584 cadres de lecture ouverts (ORF, *open reading frames*) prédits (Ozer, Allen, et Hauser 2014). Aussi, il possède un génome en mosaïque, composé de nombreux gènes centraux intercalés par des blocs de gènes spécifiques à la souche, et ce génome a été classé en trois groupes en fonction de ses caractéristiques : le génome central, le génome accessoire et le pan-génome (Valot et al. 2015).

1.1.2. Facteurs de virulence de *P. aeruginosa*

Le potentiel d'infection de *P. aeruginosa* provient de la présence de facteurs de virulence et de sa capacité à résister à plusieurs antibiotiques (Diggle et Whiteley 2020). Ces facteurs peuvent être classés en facteurs de virulence associés aux cellules ou extracellulaires (Granato et al. 2018). Les facteurs de virulence associés aux cellules sont

importants pour le processus de colonisation bactérienne et ils sont sécrétés et liés à l'enveloppe cellulaire. On outre, les facteurs de virulence extracellulaire sont libérés par *P. aeruginosa* après colonisation et sont sécrétés dans le milieu extracellulaire (Kung, Ozer, et Hauser 2010).

1.1.2.1. Flagelle

P. aeruginosa possède un seul flagelle polaire, composé d'une protéine flagelline nommée FliC. Le flagelle est constitué d'un corps basal et d'un moteur situés à l'intérieur de la membrane cellulaire, d'une tige qui s'étend à travers le peptidoglycane et les couches externes de la cellule, à laquelle sont attachés le crochet et le filament (Guttenplan et Kearns 2013). Le flagelle est nécessaire à la motilité, à l'adhésion aux cellules et à la formation d'un biofilm.

1.1.2.2. Pili ou fimbriae

P. aeruginosa possède une structure filamenteuse sur leurs surfaces appelées pili ou fimbriae, ils sont composés de milliers de molécules d'une petite protéine monomère appelée la piline (Jacobsen et al. 2020). Ils sont des structures essentielles à l'initiation de l'infection en assurant la motilité et l'adhésion. Aussi, ils contrôlent la motilité des contractions utilisées pour une colonisation rapide de différentes surfaces (Talà et al. 2019).

1.1.2.3. Lipopolysaccharide

La plupart des bactéries à Gram négatif possède un composant structurel classique important de la membrane externe (MO, *outer membrane*) qui est le lipopolysaccharide (LPS). C'est un agoniste puissant qui déclenche une forte immunité inflammatoire innée. Il est composé de trois domaines : le lipide A, la région centrale et l'antigène O ou O-polysaccharide (OPS) (Maldonado, Sá-Correia, et Valvano 2016). Il joue un rôle important dans la régulation de l'interaction des bactéries avec leur hôte et constitue la principale cause de dégénérescence tissulaire et de dommages chroniques (figure 1.1) (King et al. 2009).

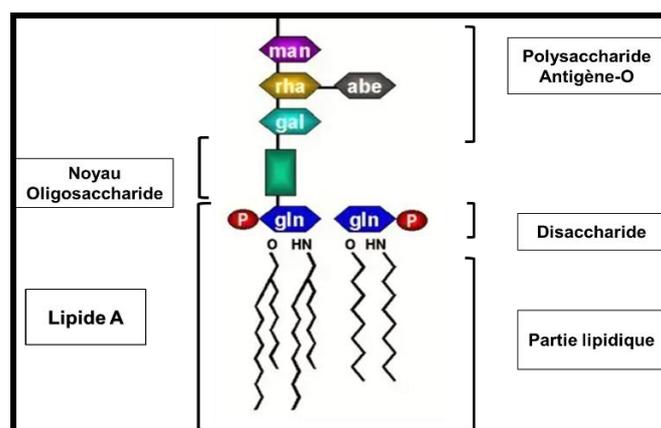


Figure 1.1. Structure du LPS (Steimle, Autenrieth, et Frick 2016). man : mannose, rha : rhamnose, abe : abéquose, gal : galactose, gln : glucosamine, P : groupe phosphate.

Le lipide A est un glycolipide hydrophobe qui ancre les deux autres fragments du LPS dans la MO et médie l'endotoxicité. Il est composé d'un squelette diglucosamine biphosphate avec des acides gras liés O et N. (Figure 1.2)(Lam et *al.* 2011).

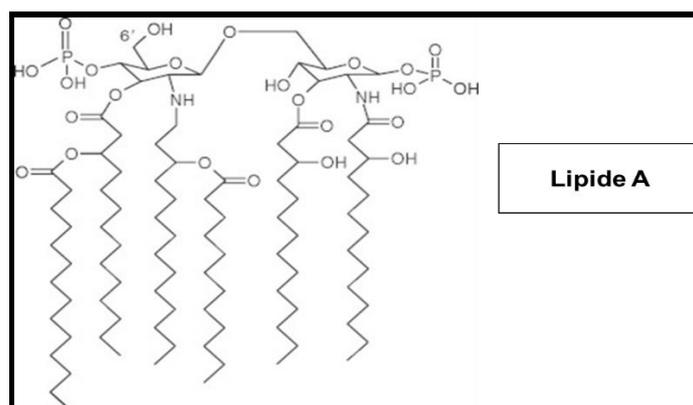


Figure 1.2. Structure chimique du lipide A de *P. aeruginosa*(Scott et *al.* 2017).

L'OPS est une longue chaîne périphérique hautement variable et immunogène de polysaccharides répétitifs. Deux formes de LPS sont exposées à la surface bactérienne, appelées « coiffées » lorsque l'OPS est présente ou absente, respectivement (Lam et *al.* 2011). De plus, Les souches de *P. aeruginosa* peuvent produire deux types différents d'antigène O (bandes A et B) dans la même cellule. La bande A (antigène commun) provoque une faible réponse en anticorps. C'est un homopolymère de d -rhamnose (d -Rha), d'une longueur d'environ 70 sucres. En revanche, la bande B (antigène spécifique) est hautement immunogène et peuvent être reconnues par les anticorps spécifiques de O, ce qui a permis l'identification d'au moins 20 sérotypes majeurs (King et *al.* 2009).

1.1.2.4. Biofilm

Les biofilms bactériens sont des agrégats coloniaux structurés de cellules, le plus souvent noyés dans une matrice de substances polymères extracellulaires (EPS, *extracellular polymeric substances*), et constitue l'une des stratégies clés pour la survie des espèces lors de changements inattendus des conditions de vie comme les fluctuations de température et la disponibilité des nutriments (Rollet, Gal, et Guzzo 2008; Yang et al. 2011). La matrice du biofilm de *P. aeruginosa* comprend principalement des polysaccharides, de désoxyribonucléique extracellulaire (ADNe, *extracellular deoxyribonucleic*), des protéines et des lipides (Ghafoor, Hay, et Rehm 2011; Stempel et al. 2013).

Le développement des biofilms est divisé en cinq étapes (Figure 1.3) :

- (1) L'attachement réversible, où les cellules s'attachent au substrat au moyen de leurs flagelles.
- (2) Un flux continu des cellules mobiles vers le site d'initiation de biofilm conduit à la formation des microcolonies. À ce stade, les pili maintiennent une motilité de contraction (Rasamiravaka et al. 2015).
- (3) Une prolifération cellulaire et la perte des organites de motilité marquent le début de la maturation du biofilm. Dans ce stade, on observe une régulation positive exponentielle de certains gènes (Ma et al. 2009).
- (4) Une fois la maturation et l'épaississement du biofilm sont terminés, le tapis cellulaire monocouche initial se transforme en une structure tridimensionnelle et adopte structurellement un assemblage multicellulaire en forme de champignon.
- (5) et enfin, la dernière étape est le détachement des cellules individuelles ou d'agrégats du biofilm, conduisant à la dispersion des cellules dans l'environnement, qui peuvent reformer un nouveau biofilm (Taylor, Yeung, et Hancock 2014).

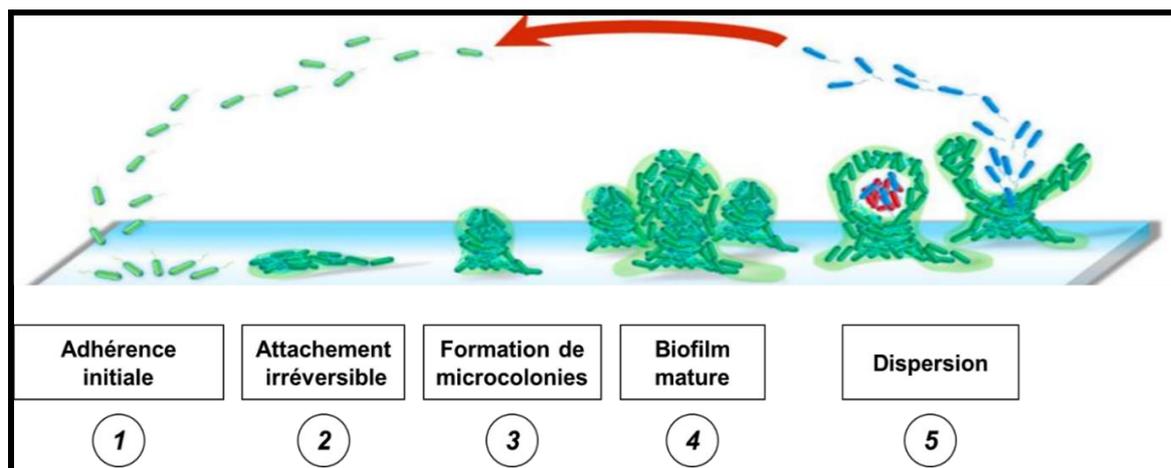


Figure 1.3. Cycle de développement du biofilm de *P. aeruginosa* (Thi, Wibowo, et Rehm 2020).

1.1.2.5. Facteurs sécrétés

1.1.2.5.1. Exotoxine A

L'exotoxine A est un facteur de virulence le plus toxique. Il est subdivisé en trois domaines structuraux importants et un sous-domaine mineur (Javanmardi et *al.* 2019). Le domaine N-terminal est composé d'un brin β antiparallèle et est responsable de la fixation aux cellules hôtes. Le domaine intermédiaire composé de six hélices α possède une activité de translocation membranaire, et le domaine C-terminal est le fragment toxique. Le sous-domaine mineur peut être supprimé sans perte d'activité toxique (Michalska et Wolf 2015).

L'exotoxine A provoqué l'inhibition de la production de l'interleukine 18 (IL, *interleukin*) et diminue la sécrétion de facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α , *tumor necrosis factor alpha*), IL-6 et IL-8. Aussi, il est impliqué dans l'activation de deux caspases qui sont nécessaires dans le processus d'apoptose (Wolf et Elsässer-Beile 2009).

1.1.2.5.2. Enzymes protéolytiques

P. aeruginosa libère une quantité important de protéases extracellulaires, qui sont les élastases LasA, LasB, la protéase alcaline et la protéase de type IV (PIV) (Jurado-Martín, Sainz-Mejías, et McClean 2021).

LasB, le principal facteur de virulence extracellulaire, est une métalloprotéase zinc-dépendante de la famille des thermolysines codée par le gène *lasB* (Gellatly et Hancock 2013). Elle est impliquée dans le clivage des protéines de l'hôte, notamment les cytokines, les composants de l'inflammasome et les immunoglobulines (Yang et *al.* 2017; Kung, Ozer, et Hauser 2010).

Chapitre 1. Revue de la littérature

LasA est une sérine protéase codée par le gène *lasA*. Son expression a été corrélée à la résistance aux antibiotiques dans les isolats cliniques de *P. aeruginosa* (Jurado-Martín, Sainz-Mejías, et McClean 2021).

La protéase alcaline est une métalloendopeptidase dépendante du zinc codé par le gène *aprA*. Elle permet le clivage des monomères de flagelline libres et peut réduire la clairance mucociliaire des bactéries en activant le canal sodique épithélial (ENaC, *epithelial sodium channel*) (Butterworth et al. 2012). Elle contribue également à la sécrétion d'autres facteurs de virulence comme la pyruvate carboxylase (PYC, *Pyruvate carboxylase*) (Iiyama et al. 2017).

La protéase de type IV est une sérine protéase qui est codée par le gène *piv* (Conibear et al. 2012). Elle joue un rôle important dans la pathogenèse de *P. aeruginosa* dans les poumons et favorise l'évasion immunitaire en dégradant le plasminogène, et les immunoglobulines (Malloy et al. 2005; Smith et al. 2006).

1.1.2.5.3. Pyocyanine

La pyocyanine est un métabolite secondaire rédox responsable de la couleur bleu-verdâtre des colonies de *P. aeruginosa* en culture. Cette protéine est capable d'augmenter les espèces réactives de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*) et peroxyde d'hydrogène (H₂O₂, *hydrogen peroxide*) intracellulaires, qui provoque un stress oxydatif et endommagent les composants du cycle cellulaire (Hall et al. 2016). Ainsi, elle induit également la libération de ROS mitochondriales et conduit à l'apoptose des neutrophiles (Managò et al. 2015).

1.1.4. Aspect épidémiologique

P. aeruginosa se caractérise par sa capacité élevée d'adaptation à différents environnements. Ce germe est détecté dans une grande variété d'habitats, y compris le corps humain, l'eau, le sol et l'environnement hospitalier (Crone et al. 2020 ; Remold et al. 2011).

Les infections à *P. aeruginosa* sont fréquentes chez les personnes immunodéprimées telles que les patients atteints du diabète sucré incontrôlé, de la fibrose kystique, du cancer, et du SIDA (Mulcahy, Isabella, et Lewis 2014). Cette bactérie est responsable d'infections nosocomiales qui se manifestent par une pneumonie, des infections des voies urinaires, une bactériémie et des infections du site opératoire.

1.1.5. Résistance de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa présente une résistance à plusieurs antibiotiques, notamment les quinolones, les β -lactamine, les aminosides les fluoroquinolones et les polymyxines (Hancock et Speert 2000). Les mécanismes de résistance aux antibiotiques de cette bactérie peuvent être classés en trois groupes : intrinsèque, acquise et adaptative (Horcajada et al. 2019).

1.1.5.1. Résistance intrinsèque

Dans cette résistance, la bactérie fait référence à sa capacité innée à diminuer l'efficacité d'un antibiotique spécifique grâce à des caractéristiques structurelles fonctionnelles inhérentes (Uddin et al. 2021). Elle possède un niveau élevé de résistance intrinsèque à la plupart des antibiotiques grâce à une perméabilité restreinte de la membrane externe, des systèmes d'efflux qui pompent les antibiotiques hors de la cellule et la production d'enzymes inactivant les antibiotiques (Breidenstein, De La Fuente-Núñez, et Hancock 2011).

1.1.5.2. Résistance acquise

Les mécanismes acquis peuvent être induits par mutations génétiques chromosomiques ou par transfert horizontal. La résistance acquise de *P. aeruginosa* contribue grandement au développement de souches multirésistantes, ce qui augmente la difficulté d'éradiquer ce micro-organisme et conduit davantage à des cas d'infections persistantes (Pang et al. 2019).

1.1.5.3. Résistance adaptative

La résistance adaptative augmente la capacité d'une bactérie à survivre à une attaque aux antibiotiques en raison d'altérations transitoires de l'expression des gènes ou des protéines (Sandoval-Motta et Aldana 2016). Chez *P. aeruginosa*, les mécanismes de résistance adaptative les mieux caractérisés sont la formation de biofilm et la génération de cellules persistantes (Taylor, Yeung, et Hancock 2014).

1.2. Les cellules lymphoïdes innées

1.2.1. Historique

La reconnaissance des lymphocytes constitue une étape majeure pour bien comprendre l'immunité. Ce travail a été commencé dans la moitié du XIX^{ème} siècle lorsque Gabriel Andral et William Addison ont fait la première description des leucocytes en 1843 (Addison 1843). Ensuite, Paul Ehrlich a identifié les cellules myéloïdes et les cellules lymphoïdes comme des lignées distinctes de globules blancs par une technique de coloration et comptage des cellules sanguines ; mais cela a pris encore un siècle pour distinguer les lymphocytes T et les lymphocytes B (Nossal et al. 1968). Puis, en 1975 Kiessling et ses collaborateurs ont découvert la première population de cellules

lymphocytaires innées (ILC, *innate lymphoid cells*): les cellules natural killer (NK, *natural killer cell*) (Herberman et al. 1975). Ce type des cellules ont été identifiées comme des lymphocytes non T et non B qui ont la capacité d'une activité cytotoxique spontanée contre les cellules tumorales sans nécessiter d'immunisation préalable (Kiessling, Klein, et Wigzell 1975). Par la suite, en 1997, R.E. Mebius et ses collaborateurs montrèrent qu'il y a une deuxième population de cellules lymphocytaires innées, les cellules inductrices du tissu lymphoïde (LTi, *lymphoid tissue inducer cells*). Ces cellules sont essentielles au développement des ganglions lymphatiques périphériques et des plaques de Peyer au cours de la vie embryonnaire (Mebius, Rennert, et Weissman 1997).

Dans les années 2008 et 2011, des études ont montré l'existence de nouvelles cellules lymphocytaires innées qui sont les cellules NK22, récepteur orphelin lié au récepteur de l'acide rétinoïque (ROR γ t, *Retinic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma t*), récepteur naturel déclenchant la cytotoxicité (NKp46+, *natural receptors triggering cytotoxicity*), NK-LTI, aussi les nuocytes ou les natural helper cells (Cella et al. 2009). Les ILCs ont été classées en trois catégories : les ILC de type 1 (dont font partie les cellules NK), les ILC de type 2 et ILC de type 3 (dont font partie les LTi) (Spits et al. 2013).

1.2.2. Développement et localisation

À partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH, *Hematopoietic stem cells*), il est possible d'obtenir les deux lignées cellulaires les plus importantes qui sont les cellules de la lignée myéloïde et les cellules de la lignée lymphoïde (Lee et Hong 2020). Ce dernier est à son tour divisé en deux types fondamentaux de lymphocytes qui sont les lymphocytes adaptatifs (T et B) et les lymphocytes innés (ILCs, NK, LTi). La distinction entre ces deux types se fait par les facteurs de transcriptions qui orchestrent leur développement (Kotas et Locksley 2018).

Avant la naissance, le développement des ILCs se fait dans le foie fœtal où les précurseurs des cellules lymphoïdes innées (ILCP, *innate lymphoid cell precursor*) sont générés à partir des cellules souches hématopoïétiques CD34+. Dans ce compartiment, les ILCP qui expriment ROR γ t et produisent l'IL-17A indiquent un phénotype ILC3 alors que les ILCP qui produisent l'interféron de type gamma (INF γ , *Interferon gamma*) ou IL-13 peuvent différenciés en ILC1 et ILC2 (Lim et al. 2017).

Après la naissance, le développement des ILCs se produit dans la moelle osseuse et commence comme pour les lymphocytes B et T par un progéniteurs entièrement lymphoïdes (ALP, *all lymphoid progenitors*) contenant l'antigène lymphocytaire Ly6 membre de la famille D (Ly6D⁻, *lymphocyte antigen 6 family member D*) progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) et qui expriment des niveaux élevés d'IL-7R α et indépendant de la signalisation γ c (Harly

et al. 2018). Ces ALP peuvent se différencier en progéniteurs précoces ILC (EILP, *early ILC progenitors*) qui sont caractérisés par Lin⁻, Facteur de transcription 7 spécifique des lymphocytes T (Tcf7⁺, *Transcription factor 7 T cell specific*), l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ ⁺, le récepteur 2B4⁺, CD127⁻, antigène 1 des thymocytes (Thy1⁻, *Thymocyte antigen 1*), CD25⁻, CD122⁻, récepteur 6 de chimiokine à motif C-X-C (CXCR6⁻, *C-X-C motif chemokine receptor 6*) et qui peuvent exprimer tous les facteurs de transcriptions qui sont nécessaires pour le développement des lymphocytes innées comme le facteur nucléaire IL-3 induit (Nfil3, *nuclear factor IL-3 induced*), protéine de boîte de groupe à haute mobilité associée à la sélection des thymocytes (Tox, *thymocyte selection-associated high mobility group box protein*), inhibiteur de la liaison à l'ADN2 (Id2, *inhibitor of DNA binding 2*), et facteur de transcription 3 lié à l'avorton (Runx3, *runt-related transcription factor 3*) mais ils n'expriment pas le CD127 (Ghaedi et Takei 2021). Il y a deux étapes successives de précurseurs : EILP spécifiés (*Flt3^{hi} Zbtb16^{lo}*) et EILP engagés (*Flt3^{lo} Zbtb16^{hi}*). Ces dernières sont des progéniteurs engagés de cellules NK et d'ILC (Harly et al. 2019). Les EILP jouent un rôle important car ils sont des intermédiaires entre les ALP et les ILCP (Harly et al. 2018). Les EILP se différencient en progéniteurs ILC de type assistant commun (CHILP, *common helper-like ILC progenitors*) (Klose et al. 2014). Les CHILP sont identifiés comme des cellules Lin⁻ Id2⁺ CD127⁺ CD25⁻ $\alpha 4\beta 7$ ⁺ dont le principal rôle d'Id2 est d'empêcher le développement des lymphocytes T et B (Scoville, Freud, et Caligiuri 2019; Boos et al. 2007). En fonction de l'expression de facteurs de transcription doigt de zinc de la leucémie promyélocytaire (PLZF ; codé par le *Zbtb16*, *promyelocytic leukaemia zinc finger protein*) et la protéine de liaison GATA 3 (GATA3, *GATA binding protein 3*), les CHILP peuvent se diviser en deux sous-ensembles : GATA-3^{lo} PLZF⁻ et GATA-3⁺ PLZF⁺. Les GATA-3^{lo} PLZF⁻ CHILP possèdent la capacité à produire des LT_i alors que les GATA-3⁺ PLZF⁺ CHILP sont appelés précurseurs engagés des ILC (ILCP) qui peuvent exprimer le marqueur de la mort cellulaire programmée de surface cellulaire (Pd-1, *programmed cell death 1*) (Constantinides et al. 2014 ; Yu et al. 2016).

Les ILCP, également appelés précurseur lymphoïdes α (α LP, *α -lymphoid precursor*), sont des précurseurs uni- et multipotentes qui perdent leurs capacités à produire les lymphocytes adaptatives T et B (Zook et Kee 2016; Kotas et Locksley 2018). Ils sont caractérisés par l'absence d'expression de Flt3 et la présence à leur membrane de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ et du récepteur de chimiokine de type 6 (CXCR6, *C-X-C chemokine receptor type 6*). La génération des ILCP repose sur l'expression d'un grand nombre des facteurs de transcription tels que le virus de l'érythroblastose aviaire E26 (ETS1, *avian erythroblastosis virus E26 homologue-1*) (Gronke, Kofoed-Nielsen, et Diefenbach 2016) qui sont nécessaires

pour la différenciation des ILCs et leur déplacements vers les tissus périphériques (Crinier et *al.* 2017).

Les EILP se différencient également en progéniteurs pré-NK (NKP, *natural killer progenitors*) qui sont des cellules $\text{Lin}^- \text{NK1.1}^- \text{DX5}^- \text{CD122}^+$ et caractérisés par l'expression de la chaîne β du récepteur IL-2/IL-15 (CD122). Les NKP se différencient en NK (Figure 1.4) (Geiger et Sun 2016; Rosmaraki et *al.* 2001).

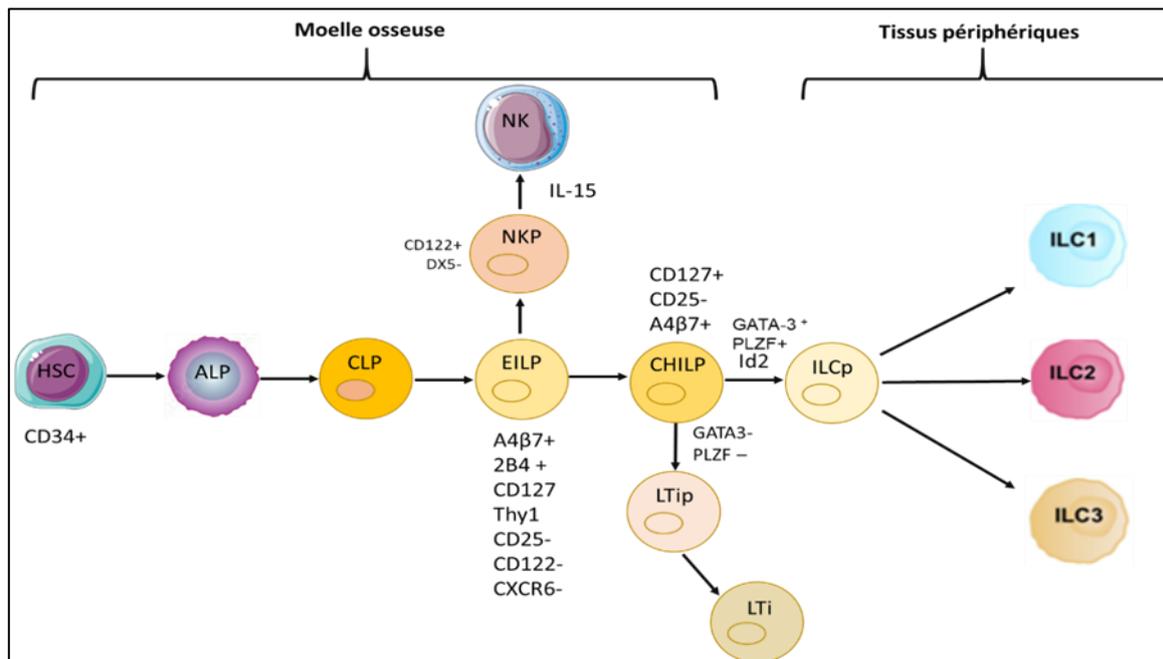


Figure 1.4. Développement des cellules lymphoïdes innées(Ghaedi et Takei 2021). Les EILP (early ILC progenitors) se différencient en deux majeurs progéniteurs qui sont les NKP (natural killer progenitors) et les CHILP (common helper-like ILC progenitors). Les NK se développent à partir des NKP alors que les CHILP se différencient en deux précurseurs : les ILCP et les LTip qui donnent les LTI. Les sous-populations des ILC (ILC1, ILC2 et ILC3) se développent à partir des ILCP. Le développement des ILCs est sous le contrôle des facteurs de transcription tels que : Id2 (inhibitor of DNA binding 2), et facteur de transcription 3 lié à l'avorton (Runx3, runt-related transcription factor 3), PLZF (facteurs de transcription doigt de zinc de la leucémie promyélocytaire), GATA 3 (la protéine de liaison GATA 3).

1.2.3. Sous populations

Les ILCs sont divisées en quatre groupes : ILC1, ILC2, ILC3 et ILC régulateur (ILCregs) en fonction de leur expression de cytokines et de facteurs de transcriptions (Spits et *al.* 2013).

1.2.3.1. ILC de type 1

Les ILC1s (figure 1.5) sont elles-mêmes divisées en 3 sous-populations qui sont les cellules NK conventionnelles (NKc, *Conventional natural killer*) et ILC1s auxiliaires du type

1(Th1, *T helper cells*) et aussi les ILC1s intraépithéliales (Artis et Spits 2015; Fuchs et al. 2013) (Figure 1.5).

Les ILC1s se localisent dans les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses, dans le foie et dans la caduque de l'utérus (Juelke et Romagnani 2016). et jouent un rôle important dans le contrôle des parasites intracellulaires (the Immunological Genome Consortium et al. 2015). Ces cellules sont capables de produire l'interféron- gamma (IFN- γ) (Colonna 2018).

Les ILC1s intraépithéliales sont capable d'initier des réponses IFN- γ contre les agents pathogènes (Kansler et Li 2019). Elles expriment le CD103, CD9, Eomesodermine (Eomes) et CD160. Ces cellules sont indépendantes de l'IL-15 R α pour leur développement mais besoin d'autres cytokines comme IL-7 et IL-2 (Strober et Fuss 2011; Buonocore et al. 2010).

Les NKc sont une population lymphoïde effectrice ayant la capacité de lyser les cellules tumorales (Herberman et al. 1975). Ces cellules représentent 5 à 15% des lymphocytes sanguins chez l'homme. Ces cellules circulent dans tout le corps pour détecter et éliminer directement les cellules infectées et transformées. Elles sont caractérisées par l'expression du NKp46 et autres molécules comme CD56, CD16 et CD94 ; ainsi que par l'expression de récepteur du lymphocyte T (TCR, *T cell receptor*) et le récepteurs activateurs, inhibiteurs supplémentaires (Romagnani et al. 2007 ; Vivier et al. 2008). Les cNK se résident dans les tissus dans plusieurs organes et ont besoin de l'IL-12 pour la production d'IFN- γ . Elles sont caractérisées par l'expression des facteurs de transcription comme : T-box-expressed-in-T-cells (T-bet) et Eomes (Villanova et al. 2014).

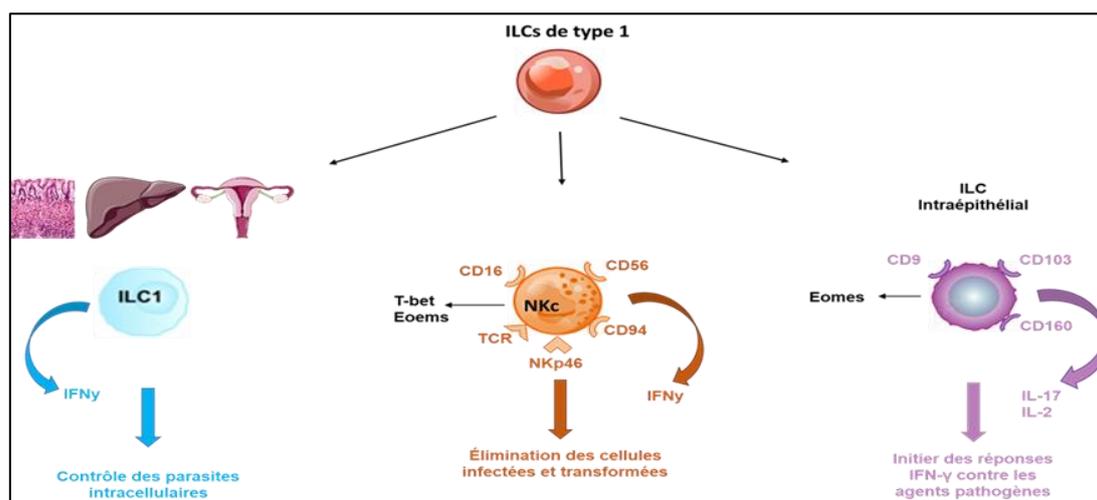


Figure 1.5. Sous populations des ILC de type 1 (D. E. Cherrier, Serafini, et Di Santo 2018). ILC, innate lymphoid cells ; NKc, Conventional natural killer ; IFN γ , Interferon gamma ; TCR, T cell receptor ; T-bet, T-box-expressed-in-T-cells ; Eomes, Eomesodermine ; CD, cluster of differentiation ; NKc, conventional natural killer cell ; IL, Interleukin.

1.2.3.2. ILC de type 2

Les ILC2s (figure 1.6) sont les équivalents innés du TH2. Elles sécrètent l'IL-5, l'IL-13, IL-9 et IL-10 et se localisent chez l'homme au niveau des poumons, des tissus adipeux, des amygdales et l'intestin foetal. Ces cellules expriment le CD161, l'IL-7R α , l'IL-2R α , l'IL-33R, la molécule homologue du récepteur chimioattractant du récepteur de la prostaglandine D2 et les facteurs de croissance GATA3, récepteur nucléaire orphelin ROR alfa (ROR α , *orphan nuclear receptor ROR alfa*), Id2 et NFIL3 (Wong et al. 2012).

Les ILC2s sont impliqués dans les réponses immunitaires contre les infections par les helminthes, et aussi dans la pathogenèse de maladies inflammatoires et les infections virales. Elles favorisent également la réparation des tissus (Juelke et Romagnani 2016) (figure 1.6).

Les ILC2 peuvent être regroupées en deux sous-ensembles : ILC2 naturelles et ILC2 inflammatoires. Les ILC2s naturelles, aussi appelées ILC2 homéostatiques (nILC2, *homeostatic or natural ILC2*) sont induites par l'IL-33 dans les tissus barrières et sont impliquées dans la réparation des tissus et la biogenèse de la graisse beige avec leur rôle majeur dans la protection immunitaire (Y. Huang et Paul 2016). On outre, les ILC2s inflammatoires (iILC2, *inflammatory ILC2*) sont induites par l'IL-25 et sont considérées comme des progéniteurs ILC transitoires mobilisés par l'inflammation et l'infection (Y. Huang et al. 2015).

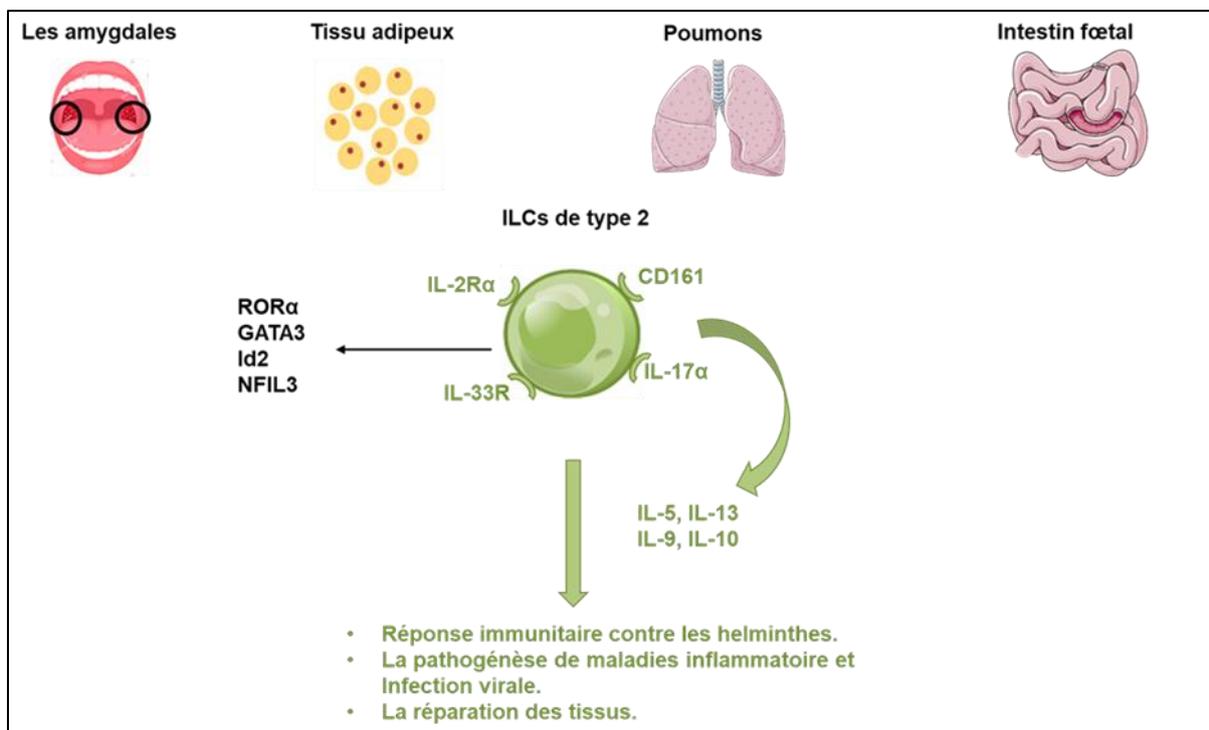


Figure 1.6. Sous population des ILCs de type 2 (Walker et McKenzie 2013). IL, Interleukin; GATA3, binding protein; ROR α , orphan nuclear receptor ROR alfa; Id2, inhibitor of DNA binding 2; NFIL3, nuclear factor IL-3 induced; ILC, innate lymphoid cell; CD, clusters of differentiation.

1.2.3.3. ILCs de type 3

Les ILC3s (figure 1.7) sont parmi les premières cellules immunitaire à ensemencer le tissu intestinal. Ces cellules se caractérisent par l'expression du facteur de transcription ROR γ t qui est essentiel pour leur développement. Elles sont très importantes pour la régulation de la réaction inflammatoire, de l'immunité dans le tractus gastro-intestinal et les tissus lymphoïdes associés (Melo-Gonzalez et Hepworth 2017). Les ILC3s jouent un rôle important dans le développement des réponses immunitaires protectrices contre les infections bactériennes extracellulaires (Rankin et al. 2016). Elles produisent les cytokines de Th17 et Th22 tels que IL-17A/F, IL-22 (Reynders et al. 2011). Les ILC3s se divisent en deux sous populations importantes, les ILC3 (NKp46) et LTi (Figure 1.7)(Rankin et al. 2016).

Les LTi se caractérisent par l'expression de récepteurs naturels de cytotoxicité (NCR, *natural cytotoxicity receptors*) donc elles sont identifiées comme des cellules NCR+ ILC3 (Klose et al. 2013). Elles sont considérées comme un sous ensemble des ILC3s parce qu'elles sont capables de sécréter l'IL-22 et d'initier une réponse immunitaire contre les infections extracellulaires et elles expriment le facteur de transcription ROR γ t (Sonnenberg et al. 2011; Eberl et al. 2004). Les LTi expriment à leur surface une molécule présentatrice d'antigène CD83, CCR6, le récepteur de chimiokine C-X-C de type 5 (CXCR5, *C-X-C chemokine receptor type 5*), le ligand Notch 1 canonique de type Delta (DLL1, *Delta Like Canonical Notch Ligand 1*), antigène lymphocytaire 6 membre de la famille C (Ly6C, *lymphocyte antigen 6 family member C*) et la protéine de mort cellulaire programmée 1 (PD-1, *Programmed cell death protein 1*). Les LTi expriment également des régulateurs de transcription tels que la protéine 2 de réponse à la croissance précoce (Egr2, *Early growth response protein 2*), Inhibiteur de différenciation 1 (Id, *Inhibitor of Differentiation 1*), l'inhibiteur de différenciation 3 (Id3, *Inhibitor of Differentiation 3*), des cytokines, des chimiokine et des facteurs de croissance tels que IL-17F, le ligand de chimiokine à motif C-C 21 (CCL21, *C-C motif chemokine ligand 21*)(Zhong et al. 2016). Enfin, la fonction principale des LTi, en association avec les populations organisatrices des tissus lymphoïdes endothéliaux, est l'organogenèse des tissus lymphoïdes secondaires périphériques tels que le ganglion lymphoïde mésentérique et les plaques de Peyer dans l'intestin grêle mais elles sont également impliquées dans le développement, l'activation et le fonctionnement des lymphocytes B et T (Onder et al. 2013; Zhong, Zheng, et Zhu 2018).

Les ILC3 NKp46 sont identifiées comme CCR6⁻ ILC3 Lin⁻NKp46⁺NK1.1^{low/-} cellules (Eberl et al. 2004 ; Yokota et al. 1999 ; Klose et al. 2014). Elles nécessitent le facteur de transcription T-bet pour leur développement et pour l'expression de récepteur NKp46 sur leurs surfaces (Sato-Takayama et al. 2008 ; Rankin et al. 2013). Elles sécrètent l'IL-22 et peuvent être impliquées dans les réponses immunitaires contre les agents pathogènes et la régulation de microbiote intestinal (Sanos et al. 2009).

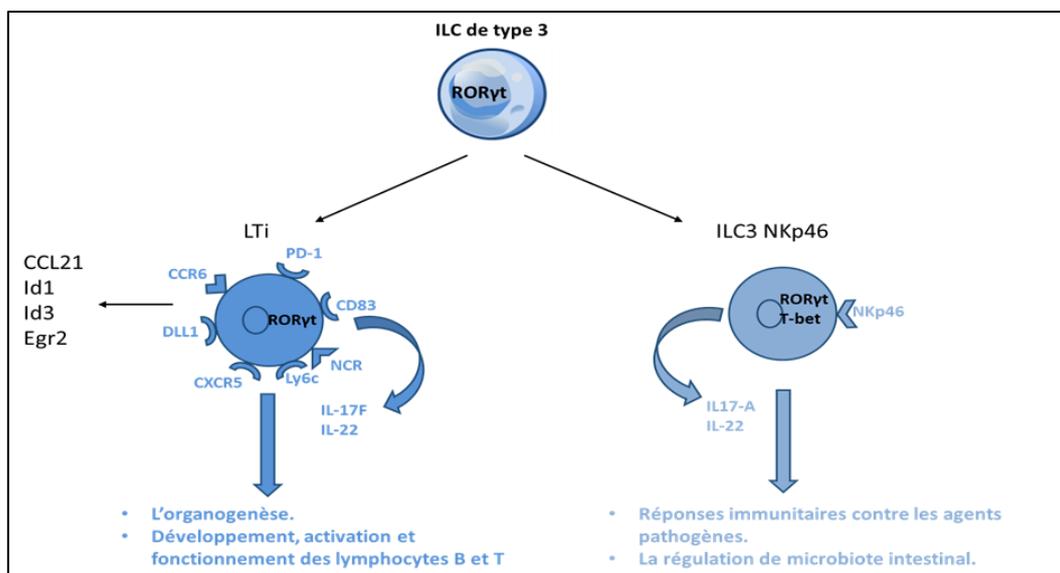


Figure 1.7. Sous population ILC de type 3 (Melo-Gonzalez et Hepworth 2017). ILC, innate lymphoid cell ; LTi, lymphoid tissue inducer cells, PD-1, programmed cell death 1 ; DLL1, Delta Like Canonical Notch Ligand 1 ; CXCR5, C-X-C chemokine receptor type 5 ; Ly6c, lymphocyte antigen 6 family member C ; IL, Interleukin ; NCR, natural cytotoxicity receptors ; CD, clusters of differentiation ; Id1, Inhibitor of Differentiation 1 ; Id3, Inhibitor of Differentiation 3 ; Egr2, Early growth response protein 2 ; CCL21, C-C motif chemokine ligand 21 ; RORγt, Reticin-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma t ; T-bet, T-box-expressed-in-T-cells.

1.2.3.4. ILC reg

C'est une nouvelle population des ILCs qui a été identifiée dans les intestins de souris et d'homme par Wang et coll (Wang et al. 2017). Ces cellules proviennent d'un précurseur CHILP et expriment les facteurs de transcription ID3 et Sox4. Elles produisent deux cytokines, IL-10 qui supprime l'activation des ILCs1 et des ILCs3 et les facteurs de croissance et de transformation bêta (TGFβ, *Transforming growth factor-β*) qui est nécessaire au maintien des ILCregs (Wang et al. 2020).

1.2.4. Plasticité

Les ILCs, comme les sous-population des cellules Th, les macrophages et les neutrophiles, ont la capacité à modifier leurs phénotypes et leurs fonctions en tant que mécanisme d'adaptation à leur environnement tissulaire (Heinrich et Korangy 2022). Ce

mécanisme est la plasticité des ILCs qui est déclenché par des signaux comme les facteurs de transcription et les changements des conditions environnementales ou des agents pathogènes. Ces signaux activent des voies de signalisations intracellulaires qui conduisent à la productions des cytokines et l'expression des récepteurs et des marqueurs qui ne sont pas caractéristiques de leur groupe mais d'un autre groupe d'ILCs (Bernink et al. 2015 ; Bal, Golebski, et Spits 2020 ; Crinier et al. 2017).

La plasticité est considérée comme une clé majeure de l'hétérogénéité des ILCs et joue un rôle important dans l'orientation et l'accélération de la réponse immunitaire. (Figure 1.8) (Villanova et al. 2014 ; Vivier et al. 2018 ; Li et al. 2019). Une plasticité distincte unidirectionnelle et bidirectionnelle a été décrite dans les ILCs.

1.2.4.1. Plasticité NK/ILC1

Les NK et les ILC1s présentent des caractéristiques phénotypiques très similaires tels que leur capacité à sécréter l'INF γ , l'expression de facteur de transcription T-bet et l'importance de l'IL-15 pour leur développement (Fuchs et al. 2013; Colonna 2018). Il existe également des différences entre les NK et les ILC1s car ces derniers sont capables d'exprimer plusieurs facteurs de transcription tels que Id2, GATA3 et PLZF alors que les NK ne nécessitent pas ces facteurs (Samson et al. 2003 ; Yagi et al. 2014 ; Serafini et al. 2014 ; Constantinides et al. 2014 ; Klose et al. 2014). A cause de ces différences, on peut considérer les NK et les ILC1s comme deux populations distinctes donc il y a une plasticité entre elles (De Salvo, Buena, et Pizarro 2020).

La plasticité NK-ILC1 est piloté par la signalisation de cytokine TGF- β qui est essentiel pour la différenciation des ILC1 et qui stimule la conversion des cellules NK (CD49a⁻ CD49b⁺ EOMES⁺) en ILC1 intermédiaires (CD49a⁺ CD49b⁺ Eomes⁺) et en population ILC1 (CD49a⁺ CD49b⁻ Eomes int) dans le microenvironnement tumoral (Gao et al. 2017).

Après une infection bactérienne, la sécrétion de l'IL-12 peut transformer les cellules Eomes⁺NK en cellule Eomes⁻ ILC1 (Park et al. 2019). L'expression de facteur de transcription Eomes entraîne la transformation des cellules T-bet⁺ ILC1 en cellules CD49b⁺ NK (Pikovskaya et al. 2016).

1.2.4.2 Plasticité ILC3/NK

Grâce aux cytokines pro-inflammatoires IL-15 et IL-12, les ILCs3 peuvent se transformer en cellules CD94⁺ T-bet⁺ Eomes⁺ NK. Les ILC3 transformés expriment aussi les récepteurs NKG2A, NKG2C, CD56 et CD16 de cellules NK avec tous les composants de la machinerie cytotoxiques (Raykova et al. 2017). En présence de l'IL-1 β , cette

transformation est inhibée par le facteur de transcription récepteur d'aryl d'hydrocarbone (AHR, *aryl hydrocarbon receptor*) (Hughes et al. 2014).

1.2.4.3 Plasticité ILC1/ILC2

Au cours d'une inflammation dans les poumons et en réponse à l'IL-12 et l'IL-1 β , les ILC2 résidentes deviennent capable d'exprimer T-bet et de sécréter l'IFN- γ qui sont des caractéristiques des ILC1s (Ohne et al. 2016; Belz 2016; Gronke, Kofoed-Nielsen, et Diefenbach 2016). D'autre part, la conversion d'ILC1 vers ILC2 se fait grâce à l'IL-4. Cette transformation conduit à l'expression dépendante de GATA3 des cytokines de type 2 : IL-4, IL-13 et l'IL-5 qui sont essentiels pour l'immunité antiparasitaire (Bal et al. 2016).

1.2.4.4 Plasticité ILC1/ILC3

Dans les tissus muqueux enflammés, l'IL-12, l'IL-2 et l'IL-15 sécrétées par les cellules dendritiques conventionnelles (DC, *conventional dendritic cell*) et les monocytes favorisent la différenciation de NKp44- et NKp44+ ILC3 en ILC1 exprimant la chaîne α de récepteurs de l'IL-7 (CD127) ce qui induit une régulation positive du T-bet et IL-12R β 2 (Bernink et al. 2013 ; 2015 ; Crinier et al. 2017; Cella, Otero, et Colonna 2010). À l'inverse, la conversion des ILC1 CD127+ en ILC3 est induit par l'IL-2, l'IL-23 et l'IL-1 β , sécrétées par les DC exprimant CD103 (intégrine α Eb7) (Gronke, Kofoed-Nielsen, et Diefenbach 2016). L'IL-23 entraîne l'activation de facteur de transcription transducteur de signal et activateur de transcription 4 (STAT4, *signal transducer and activator of transcription 4*) qui est responsable de la transformation des ILC1s en ILC3s (Colonna 2018).

1.2.4.5 Plasticité ILC2/ILC3

Les ILC2 inflammatoires se différencient en cellules ILC3-Like en réponse à l'IL-1 β , IL-23 et TGF- β . La plasticité ILC2-ILC3 induit une régulation négative de GATA3 et une régulation positive de l'expression de ROR γ t. Les ILC3-Like sont capables de sécréter l'IL-17 et jouer un rôle essentiel dans l'immunité antifongique et antiparasitaire (Bernink et al. 2019 ; Huang et al. 2015).

1.2.4.6 Plasticité ILC3 NCR-/ILC3 NCR+

La plasticité des ILC3NCR- en ILC3NCR+ se fait de façon dépendante du facteur de transcription T-bet et de la voie de signalisation Notch (Crinier et al. 2017). Cette transformation est inhibée par le TGF- β (Viant et al. 2016).

1.2.4.7 Plasticité iILC2/nILC2

La voie de signalisation Notch a induit l'expression de récepteur orphelin C lié au RAR (*Rorc*, *RAR Related Orphan Receptor C*) dans les nILC2s ce qui provoque une double production d'IL-13 /IL17, convertissant nILC2s en iILC2s (K. Zhang et al. 2017).

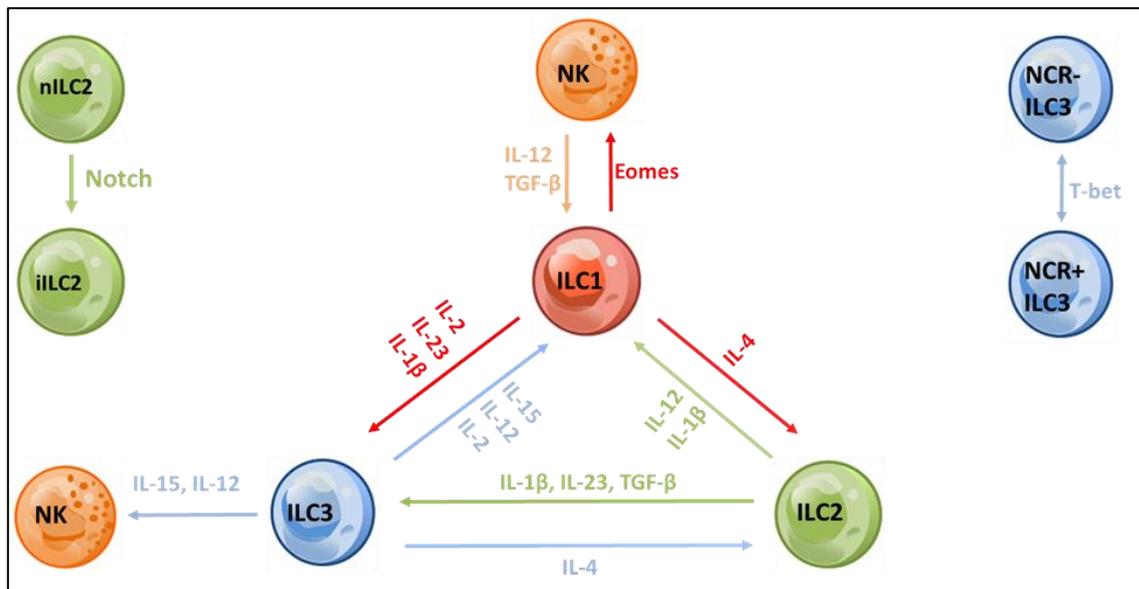


Figure 1.8. Plasticité des ILCs (Shao et al. 2021). ILC, innate lymphoid cell; IL, interleukin; TGF-β, Transforming growth factor β; NK, natural killer cell; NCR, natural cytotoxicity receptors; nILC2, natural ILC2; iILC2, inflammatory ILC2.

1.2.5. Fonctions des ILCs

Les ILCs sont des cellules immunitaires innées récemment décrites qui reflètent les caractéristiques des lymphocytes T CD4+. Ces cellules sont capables de produire une large gamme des cytokines qui jouent un rôle important dans divers processus immunologiques (Mohammadi et al. 2018). Les ILCs semblent jouer des rôles dans la protection de la barrière épithéliale, les réponses immunitaires innées contre les micro-organismes infectieux, le remodelage des tissus et l'organogenèse lymphoïde et l'inflammation. Une dérégulation de ces cellules peut entraîner des pathologies chroniques telles que des allergies, une auto-immunité (comme la polyarthrite rhumatoïde) et une inflammation (c'est-à-dire une maladie inflammatoire de l'intestin) (Yazdani et al. 2015).

1.2.5.1. Rôle des ILC1s

Après infection des cellules de l'hôte par un virus ou des bactéries, il y a une production de plusieurs cytokines, telles que l'IL-12, l'IL-15 et l'IL-18. Ces cytokines activent les ILC1s qui sécrètent les cytokines effectrices, IFN-γ et TNF-α, qui sont à l'origine de l'activation des macrophages et de la production de radicaux oxygénés (Klose et al. 2014).

La production d'IFN- γ par les ILC1s est nécessaire pour la production du mucus (Klose et *al.* 2013).

Les ILC1s jouent un rôle important dans les maladies inflammatoires de l'intestin humaine. ILC1 est situé dans lamina propria qui exprime CD161 et CD127, il est probable que ces cellules impliquées dans l'immunité contre les pathogènes intracellulaires (Bernink et *al.* 2013).

Chez les patients atteints d'une infection chronique par l'hépatite B, il y a une augmentation des ILC1s, indiquant que cette population peut contribuer à l'immunité en réponse à des agents pathogènes spécifiques chez l'homme (Z. Yang et *al.* 2015).

1.2.5.2. Rôle des ILC2s

L'activation des ILC2s se fait par les cytokines lymphopoïétine stromal thymique (TSLP, *thymic stromal lymphopoietin*), IL-25, IL-33 et elles interviennent après l'infection par des parasites (M. Cherrier 2014). Elles produisent l'IL-5 et l'IL-13 qui induisent la production de matrice extracellulaire, l'activation de macrophage de type 2 (M2) ce qui permet l'élimination des parasites et induction de la vasodilatation (Klose et Artis 2016).

Les ILC2s jouent un rôle important dans le tissu adipeux viscéral. Une fois ces cellules sont stimulées par IL-33 dans le pancréas, elles peuvent inciter les cellules dendritiques (DC, *dendritique cells*) à sécréter de l'acide rétinoïque qui favorise la sécrétion d'insuline par les cellules β et la régulation du glucose (Dalmas et *al.* 2017). Dans l'intestin, les cellules épithéliales secrètent des niveaux élevés d'IL-25 à la suite d'une infection par des helminthes qui active l'ILC2s. Ces dernières secrètent l'IL-13 qui conduit à la différenciation des cellules épithéliales vers la ligne sécrétoire. Cette réaction commande le remodelage tissulaire nécessaire à l'expulsion des grands pathogènes multicellulaires (Von Moltke et *al.* 2016 ; Gerbe et *al.* 2016). Dans les maladies inflammatoires des voies respiratoires, les ILC2s activées produisent l'IL-13 qui induit la différenciation des cellules Th2 en réponse à une inflammation pulmonaire allergique en favorisant la migration des DC activées vers les ganglions lymphatiques drainants, soutenant ainsi le développement de réponses immunitaires allergiques (Halim et *al.* 2014).

1.2.5.3. Rôle des ILC3s

Lors d'une infection par des microbes extracellulaires, les DC secrètent l'IL-23 et l'IL-1 β qui active les ILC3s. Les ILC3s sont capables de produire l'IL-17 et l'IL-22 qui favorisent la libération de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales et le recrutement des neutrophiles (Klose et Artis 2016). Après une greffe de cellules souches hématopoïétiques, l'IL-22 protège les cellules souches intestinales des lésions inflammatoires et protègent

l'organisme de la survenue d'une réaction du greffon contre l'hôte (Hanash et al. 2012). De plus, les ILC3 semblent être la principale source d'IL-22 lors d'une infection à *Candida albicans* qui est un champignon commensal présent sur les surfaces des muqueuses et de la peau (De Luca et al. 2010).

Une grande production d'IL-22 par les ILC3 est essentiel au cours de l'homéostasie en régulant les réponses de la barrière épithéliale et l'équilibre des espèces bactériennes commensales (Sonnenberg et al. 2012). De plus, il y a une corrélation positive entre les CCR6+ ILC3 et la concentration de CCL20 dans le liquide synovial des patients atteints de Polyarthrite rhumatoïde ce qui suggèrent que ces cellules jouent un rôle dans la pathogenèse de cette maladie par la production d'IL-17 et l'IL-22 (Takaki-Kuwahara et al. 2019).

La production d'IL-17 par les ILC3 régulent l'asthme associée à l'obésité et aussi contrôle l'hyperréactivité pulmonaire induite par un régime alimentaire riche en matières grasses (Kim et al. 2014; Klose et Artis 2016). De plus, les LT α sont essentielles à la formation des tissus lymphoïdes au cours de l'embryogenèse (M. Cherrier 2014).

Enfin, les ILC3s ne produisent pas seulement l'IL-22 qui prouvant avoir un rôle protecteur mais aussi elles secrètent des lymphotoxines qui induisent la production d'immunoglobulines A (IgA) par les lymphocytes B dans l'intestin (Klose et Artis 2016).

1.3. Facteur de transcription T-bet

1.3.1. Famille T-Box

La famille des gènes T-box est d'origine ancienne et présente chez tous les métazoaires. Cette famille a été découverte grâce à des études chez la souris sur la cause génétique d'un défaut de développement de la queue, un phénotype nommé brachyury, ou T pour queue (Wattler et al. 1998). 17 gènes T-box sont divisés en cinq sous-familles: *T*, *Tbx1*, *Tbx2*, *Tbx6* et *Tbr1* qui possèdent une séquence conservée de 180 à 200 résidus d'acides aminés codants pour un domaine de boîte T (Papaioannou 2014). Ce motif conservé à la capacité de se lier de manière spécifique à la séquence consensus d'ADN AATTCACACCTAGGTGTGAAATT en tant que dimère avec les sillons majeurs et mineurs de l'ADN (Müller et Herrmann 1997). Il existe une coopération entre les protéines T-box et d'autres facteurs de transcription comme l'homéodomaine (codé par les gènes *Hox*), les protéines à doigt de zinc GATA et le domaine LIM (Naiche et al. 2005).

Les protéines T-box sont impliquées dans la régulation de la différenciation, la prolifération et le maintien de la pluripotence des cellules souches et progénitrices spécifiques aux tissus. L'expression incontrôlable des gènes codants les protéines T-box

Figure.1.9. Structure cristalline du domaine de liaison à l'ADN Tbox et localisation du facteur de transcription T-bet (Liu et al. 2016) (NCBI).

1.3.4. Expression de T-bet

1.3.4.1. Par la voie IFN- γ / STAT1 et BCR

Après une infection virale, les protéines de virus se lient aux récepteurs de cellule B (BCR, *B cell receptor*) et l'acide ribonucléique (ARN, *ribonucleic acid*) viral se lie au TLR7. Au même temps, plusieurs types de cellules produisent l'IFN- γ qui se lient à l'IFN- γ R des lymphocytes B (LB, *B lymphocyte*). Tous ces stimuli conduisent à l'activation de STAT1 qui est responsable de la régulation positive de l'expression de T-bet (Tolomeo, Cavalli, et Cascio 2022). L'expression de T-bet augmente de plus de soixante fois lors que les lymphocytes B sont stimulés avec l'IFN- γ (figure 1.10) (Xu et Zhang 2005).

1.3.4.2 Par la voie IFN- γ R/STAT1 et TCR

Après des infections par des agents pathogènes prototypiques, les peptides antigéniques se lient aux récepteurs des lymphocytes Th1. Cette liaison induit l'augmentation de plus de quatre fois des niveaux de l'acide ribonucléique messenger (ARNm, *messenger ribonucleic acid*) splénique de *TBX21* ce qui induit en synergie l'expression de T-bet dans les LTh. En plus de la signalisation via le TCR, cette expression nécessite également le facteurs de transcription STAT1 et l'IFN- γ (figure 1.10) (Huang et Bi 2021; Lazarevic et Glimcher 2011).

1.3.4.3. Par la voie IL-12R/STAT4

En l'absence de la signalisation *via* TCR, l'IL-12 peut interagir avec l'élément amplificateur de T-bet conservé à 13 kb en amont du site d'initiation de la transcription. Cette interaction conduit à l'activation de STAT4 qui est responsable de l'expression de T-bet indépendamment de l'INF- γ (figure 1.10) (Townsend et al. 2004; Yang et al. 2007).

1.3.4.5. Par la voie TLR / MyD88

La voie de signalisation extrinsèque TLR/ le facteur de différenciation myéloïde 88 (MyD88, *myeloid differentiation factor 88*) induit l'expression de T-bet dans deux types de cellules immunitaires :

- Dans les lymphocytes B et en réponse à une infection virale, la signalisation TLR /MyD88 induit l'expression de T-bet (Rubtsova et al. 2013).
- Dans les cellules NK et après une stimulation par l'IL-21, STAT3 se lie à la séquence activé MyD88 par l'IFN- γ (GAS, IFN- γ activated site) et au l'élément bien caractérisé

liant STAT3 activé (SIE, c-sis-inducible elements) conduisant à une régulation positive de l'expression de T-bet (figure 1.10) (C. Huang et Bi 2021).

1.3.4.6. Par la voie de signalisation mTOR

La cible mammifère de la rapamycine (mTOR, *The mammalian target of rapamycin*) induit l'expression de T-bet par la liaison à la protéine associée à la régulation de mTOR (Raptor, *regulatory-associated protein of mTOR*) et à la compagne insensible à la rapamycine de mTOR (Rictor, *rapamycin-insensitive companion of mTOR*) pour former deux complexes, mTORC1 et mTORC2, respectivement (Laplante et Sabatini 2009). mTORC1 cible six sites de phosphorylation de T-bet et induit l'expression de ce facteur (Chornoguz et al. 2017). L'absence de l'un de ces complexes entraîne une diminution de l'expression de T-bet (C. Huang et Bi 2021)(Figure1.10).

D'autres cytokines peuvent stimuler l'expression de facteur de transcription T-bet *via* la signalisation à partir de leurs récepteurs tels que l'IFN α R et l'IL-27R (N Powell et al. 2010).

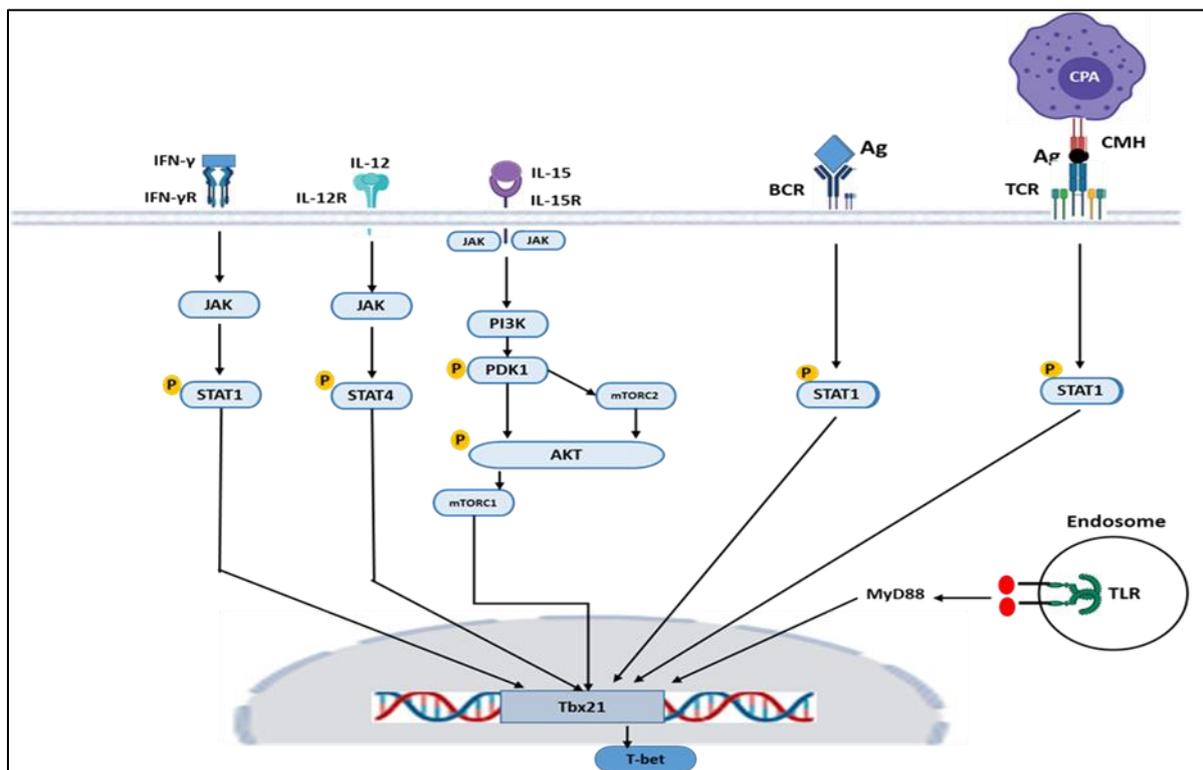


Figure 1.10. Expression de T-bet (Pritchard, Kedl, et Hunter 2019; Huang et Bi 2021). L'expression de T-bet se fait par cinq voies. Après la liaison de l'antigène (Ag) avec le récepteur des lymphocytes B (BCR), l'interaction entre le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)-peptide antigénique- récepteur des lymphocyte T (TCR) et l'interféron gamma (IFN- γ) avec son récepteur (IFN- γ R) induit la phosphorylation de facteur de transcription transducteur de signal et activateur de transcription 4 et 1 (STAT1/4) responsable de l'activation de la transcription de gène Tbx21 (Tbx21, *T-box transcription factor protein 21*) qui code pour le facteur de transcription T-bet (T-bet, *T-box-expressed-in-T-cells*). La liaison de l'interleukine 12 (IL-12) à son récepteur IL-12R induit l'activation de janus kinase (JAK) qui conduit à la phosphorylation de STAT4. Cette phosphorylation induit l'expression de T-bet. La liaison de l'IL-15 à son récepteur IL-15R induit l'activation de cible mammifère de la rapamycine mTORC1 qui conduit à l'expression de T-bet. La stimulation de Toll like receptor

(TLR) active le facteur de différenciation myéloïde 88 (MyD88) qui induit l'expression de T-bet. AKT, protéine kinase B ; PI3K, phosphoinositide 3 kinase ; PDK1, phosphoinositide dépendent kinase 1.

1.3.5. Fonctions de T-bet

1.3.5.1. Dans l'immunité adaptative

T-bet a un rôle crucial dans l'immunité à médiation cellulaire et dans la résistance à de nombreuses infections intracellulaires (figure 1.11). T-bet a été identifié comme un transactivateur de locus *IFN-γ* qui code pour IFN-γ mais peut agir également dans le cadre d'une boucle de rétroactivation négative pour limiter les réponses des lymphocytes T (Pritchard, Kedl, et Hunter 2019).

Dans des conditions de différenciation de Th1 et Th2, T-bet peut supprimer l'expression de l'IL-2 par l'inhibition de l'activité du facteur nucléaire κB (NFκB, *nuclear factor κB*) p65 (Hwang, Hong, et Glimcher 2005). De plus, la suppression de GATA3 par T-bet entraîne l'arrêt de la production de cytokines Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13) (Oh et Hwang 2014).

D'autre part, T-bet inhibe indirectement le développement de Th17 *via* l'inhibition de l'expression de l'IL-23R médiée par l'IFN-γ.

Dans les LTCD8+, T-bet est responsable de la production de l'IFN-γ, de granzyme B et de CD122. Elle a un rôle dans le développement de la mémoire et la cytotoxicité des LTCD8+ (Lazarevic, Glimcher, et Lord 2013).

Enfin, dans les lymphocytes B, T-bet induit l'expression de transcrit Iy2a et favorise le changement de classe médié par l'IFN-γ vers l'isotype IgG2a. ce facteur contrôle également l'expression de CXCR3 pour induire la migration des cellules mémoires IgG2a+B vers des sites d'inflammation (Serre et al. 2012; Lazarevic, Glimcher, et Lord 2013).

1.3.5.2. Dans les cellules non conventionnelles

Après une signalisation *via* le TCR, T-bet régule l'expression de l'IFN-γ par les LTγδ matures (Chen et al. 2007). On outre, le nombre des NKT est réduit en absence de T-bet parce que ce dernier est essentiel pour leurs développements. Les NKT nécessite T-bet pour réguler l'expression de CD122 (Lazarevic, Glimcher, et Lord 2013).

1.3.5.3. Dans l'immunité innée

Récemment, il a été démontré que les DC et les monocytes peuvent aussi exprimer le T-bet après une stimulation par l'IFN-γ (Lighvani et al. 2001). L'effet de ce facteur dans ce type de cellule est de supprimer la production de TNF dans les DC de colon et pour amorcer correctement les LTh (Lazarevic, Glimcher, et Lord 2013). L'expression de T-bet par les DC permet le maintien de l'homéostasie intestinal (N Powell et al. 2010).

1.3.6. T-bet dans les ILCs

Dans la muqueuse intestinale, les ILC représentent les cellules les plus importantes et effectrices du système immunitaire innée qui favorisent la résistance aux agents pathogènes et maintiennent l'homéostasie (Spits et Di Santo 2011). Leur contrôle transcriptionnel se fait par le T-bet qui est responsable de la régulation des réponses immunitaires et la compréhension de la pathogenèse inflammatoire (Garrido-Mesa et al. 2019). Le premier rôle de *Tbx21* dans les ILCs a été décrit par des études sur le modèle murin TRUC tandis que d'autres études ont montré que T-bet a un effet important sur le développement des ILC1s et ILC3s (figure 1.11) (Lazarevic, Glimcher, et Lord 2013).

L'expression de T-bet dans les NK périphériques est nécessaire pour contrôler la répression de l'expression de CD27, c-Kit, S1PS et KLRG1. *Tbx21* régule la production d'IFN- γ dans les cellules NK et il est considéré comme le régulateur crucial de leur activité cytotoxique (Simonetta, Pradier, et Roosnek 2016).

T-bet contrôle le pool intestinal des ILCs grâce à la régulation de la signalisation du récepteur d'IL-7. La régulation négative de l'expression d'IL-7R α dans les ILC1s et ILC3s se fait par deux méthodes : directement après son attachement au promoteur *IL-7R α* et indirectement *via* un changement dans l'expression de GATA3. En l'absence de T-bet, les ILC2s expriment l'IL-7R α ce qui favorise leur fonction sur l'immunité des muqueuses (Garrido-Mesa et al. 2019). La signalisation *via* ce récepteur conduit à une activation accrue de STAT5 et l'IL-7 peut améliorer la fonction des ILC2s (Sheikh et Abraham 2019). La suppression de l'IL-7R α induit la diminution de l'expression de l'IL-17A par les ILC intestinales car cette cytokine est responsable de développement des maladies tels que la colite ulcéreuse (Nick Powell et al. 2012).

T-bet a également un rôle majeur dans la plasticité des ILCs où l'expression suffisante de ce facteur peut agir comme un répresseur de ROR γ t ce qui donne un programme effecteur de type 1 dans ILC3s exactement dans les NKp46+CCR6-ILC3 (Tizian et al. 2020). Dans les ILC3s, l'IL-23 phosphoryle des niveaux élevés de STAT4 induits par T-bet. Cette phosphorylation robuste permet à NKp46+ CCR6-ILC3 de produire l'IFN- γ et de développer des réponses spécifiques aux ILC1s (Mikami et al. 2018). CXCR3 et le ligand CD95 (Cd95l ; également connu sous le nom de Fasl) sont aussi des cibles canoniques de T-bet dans les CCR6 – ILC3 (Lazarevic, Glimcher, et Lord 2013).

Les NKp46+ILCs sont des cellules immunitaires innées hautement spécialisées et nécessaires à la protection immunitaire intestinale. Leurs expansions pourraient être pilotées par l'intégration de signaux délivrés par les communautés microbiennes intestinales *via* la voie T-bet. Ce dernier est considéré comme le régulateur transcriptionnel essentiel des

NKp46+ ILC car il peut se lier au promoteur de *Notch2* dans les ILCs. Cette liaison se termine par l'activation de voie Notch ce qui conduit au développement des NKp46+ILC à partir de leurs précurseurs CD4-LTi (Rankin et *al.* 2013).

Une expression élevée de T-bet dans les ILCs est associée à une faible expression du ROR γ t, du récepteur de l'interleukine-7 (IL-7R), une expression élevée de la protéine liée à la p46 des cellules NK (NKp46), du récepteur 3 de la chimiokine CXCR3 (CXCR3) et de l'IFN γ . En revanche, une faible expression de T-bet dans le sous-ensemble CCR6 - ILC3s est associée à l'expression de l'IL-22 et à une faible expression ou inexistante de NKp46 et d'IFN γ (Lazarevic, Glimcher, et Lord 2013).

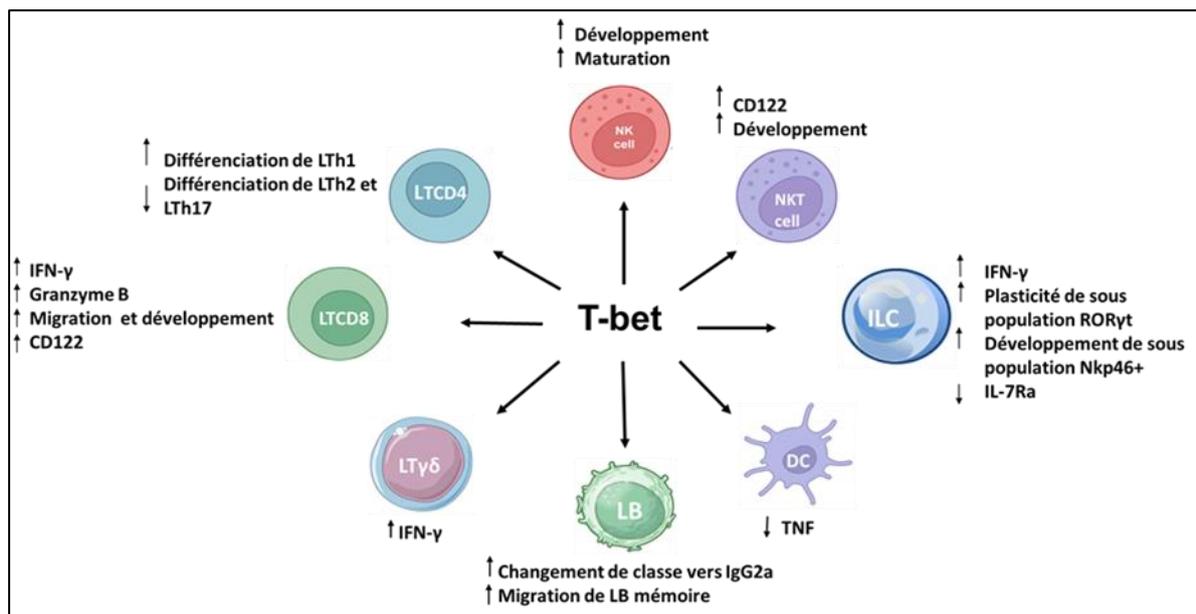


Figure 1.11. Fonctions de T-bet (Lazarevic, Glimcher, et Lord 2013). ILC, innate lymphoid cell; NKT, natural killer T cell; DC, dendritic cell; LB, lymphocyte B; LT, lymphocyte T; CD, cluster of differentiation; LTh, lymphocyte T helper; T-bet, T-box-expressed-in-T-cells; TNF, tumor necrosis factor; IFN- γ , interferon gamma, IL-7R, interleukin 7 receptor.

1.4. PCR

1.4.1. Historique

La réaction en chaîne par polymérase (PCR, *polymerase chain reaction*) est une technique qui a été décrite par Keppe et ses collègues en 1971. Puis, il a fallu encore 14 ans avant que la procédure PCR complète soit décrite et appliquée expérimentalement par Kary et ses collègues pour laquelle ils ont reçu un prix Nobel en 1985 (Lorenz 2012).

Après plusieurs années, Mullis a remarqué que la méthode de séquençage de Sanger, lors du séquençage d'un gène à copie unique produisait des signaux faibles à cause d'une concentration insuffisante d'ADN (Sanger, Nicklen, et Coulson 1977). Pour définir la longueur totale de l'amplicon a abouti à l'amplification des copies d'ADN par deux, il est

nécessaire d'ajouter une étape de dénaturation pour diviser chaque molécule d'ADN double brin (ADNdb) en deux ADN simple brin (ADNsb) et d'une amorce inverse (Mullis et *al.* 1986). Par malheur, la polymérase était désagrégée dans chaque étape dénaturation et devait être ajoutée à chaque cycle de PCR rendant la mise en œuvre de la méthode fatigante. Cela a été résolu par un système automatisé appelé « Baby Blue ». L'utilisation de la polymérase de la bactérie *Thermophilus Aquacus* (Taq polymérase) a éliminé l'ajout nécessaire de polymérase fraîche (Saiki et *al.* 1988).

1.4.2. Définition

La PCR est une technique d'amplification enzymatique de l'ADN. il s'agit d'une méthode rapide, simple et moins cher (Rumsby 2006). Elle est devenue l'une des techniques les plus utilisées dans les domaines des biosciences, du diagnostic et de la médecine légale (Zhu et *al.* 2020). Elle peut être réalisée à l'aide des source ADN provenant de divers tissus et organismes, notamment le sang périphérique, la peau, les cheveux, la salive et les microbes (Garibyan et Avashia 2013).

1.4.3. Principe

Le principe de la PCR est de réaliser de nombreuses copies d'une région spécifique d'ADN ou d'ARN à partir d'une petite quantité seulement de matériel de départ (c'est-à-dire une matrice d'ADN ou une séquence cible). Chaque test PCR a besoin d'une matrice d'ADN, d'amorces, de nucléotides et d'ADN polymérase.

1.4.4. Matériel

1. La matrice d'ADN représente le point de départ de la réaction qui peut être simple ou double brin. Elle contient la partie cible de l'ADN qui sera amplifié. Dans certains cas, la matrice est une ADN complémentaire (ADNc, *complementary DNA*) fabriqué à partir de l'ARN (Canene-Adams 2013; Kubista et *al.* 2006). Pour éviter les problèmes lors de la réalisation de PCR, les matrices d'ADN doivent être nettoyées par différentes méthodes telles que dialyse et précipitation à l'éthanol ou l'utilisation du chloroforme à des fins d'extraction et de chromatographie (Green et Sambrook 2019).
2. Les amorces sont des courts paires d'oligonucléotides synthétiques de 20 à 25 nucléotides utilisé pour la première fois par kary Mullis en 1983 (Green et Sambrook 2019; Garibyan et Avashia 2013; Álvarez-Fernández 2013). Elles sont complémentaires avec l'ADN souhaité pour l'amplification où une amorce doit

compléter le brin modèle (antisens 3' → 5') alors que l'autre amorce doit s'hybrider avec le brin non modèle (sens 5' → 3') (Lorenz 2012). La conception d'amorces est une étape cruciale lors de la réalisation de PCR pour choisir les bonnes amorces qui aide dans le ciblage et l'amplification d'une séquence nucléotidique cible (K. Li et Brownley 2010). La sélection des amorces se fait selon des critères notamment la longueur des paires de bases, les températures d'hybridation et de fusion et les répétitions des paires de bases (Guo, Starr, et Guo 2021). De nombreux facteurs susceptibles de limiter le succès d'une paires d'amorces tels que la création des dimères d'amorces, la formation des structures secondaires et les interférences Tige-boucle. Pour éviter ces problèmes, il faut utiliser des outils informatiques d'analyse de séquence pour sélectionner la meilleure paire d'amorce (K. Li et Brownley 2010).

3. L'ADN polymérase thermostable est l'enzyme clé de processus de PCR qui est capable de catalyser la synthèse de l'ADN dépendante de l'ADN matrice et à l'aide des deux amorces complémentaires respectivement des brins sens et antisens (Lamoril et al. 2007). Le choix de l'enzyme est selon la fidélité, l'efficacité et la capacité à synthétiser de gros produits d'ADN (Green et Sambrook 2019). La Taq polymérase est l'enzyme la plus utilisée en raison de sa résistance aux cycles de chauffage et de refroidissement nécessaires à la PCR (capable de survivre à des températures de 94°C) (Ghannam et Varacallo 2024).
4. Les désoxynucléotides 5' triphosphates (dNTP, deoxynucleotide triphosphate) sont les quatre bases Adénine, Guanine, Thymine et Cytosine (A, G, T et C respectivement) présentes dans l'ADN. Lors de la procédure de PCR, les nucléotides individuels sont reliés entre eux par l'ADN polymérase pour former le produit PCR final (Garibyan et Avashia 2013). La concentration idéale de chacun de ces bases est entre 20 à 200 µM. Les dNTP peuvent causer des problèmes pour la PCR en raison de leur instabilité ou lors qu'ils ne sont pas aux concentration équivalentes appropriées ($[A] = [T] = [C] = [G]$) (Lorenz 2012).
5. Les composants précédents sont placés dans un tampon pour l'ADN polymérase spécifique. Le choix de tampon affecte l'efficacité de l'amplification par PCR ainsi que la fenêtre de détection et le maintien du PH. Il existe de nombreux tampon selon la polymérase, mais le plus utilisé est Tris-Cl qui est ajouté dans la PCR à une concentration comprise entre 10 et 66 mM avec un PH compris entre 8,3 et 8,8 à température ambiante (Wolffs et al. 2004; Lorenz 2012; Green et Sambrook 2019). Il existe aussi des tampons qui contiennent l'acide chlorhydrique (HCl) et sulfate d'ammonium $[(NH_4)_2 SO_4]$ tels que Tris-HCl et Tris-SO₄, respectivement (Wages 2005).

6. L'ADN polymérase thermostable nécessite des cations divalents pour leur activité comme chlorure de magnésium ($MgCl_2$) (Green et Sambrook 2019). Elle nécessite aussi des cations monovalents (K^+ ou NH_4^+) pour ajuster la force ionique (Wages 2005).
7. L'eau stérile a été ajoutée à des concentrations appropriées pour diluer l'ADN (Wolffs et al. 2004).
8. A la fin de procédure PCR, une technique d'électrophorèse sur gel d'agarose est utilisée pour évaluer le succès de la réaction et des agents intercalants sont utilisés pour visualiser les fragments amplifiés comme le bromure d'éthidium (Wittmeier et Hummel 2022).

1.4.5. Procédure

La procédure de la PCR est commencée par mettre le mélange réactionnel, qui est composé d'eau stérile, tampon PCR, dNTP, $MgCl_2$, amorces, Taq polymérase et ADN matrice, dans un tube à essai ou une plaque à 96 puits puis placés dans un thermocycleur. Cette machine a la capacité d'augmenter et diminuer la température du bloc selon les étapes (figure 1.12) (Garibyan et Avashia 2013; Lorenz 2012). Cette procédure se déroule en trois phases :

1.4.5.1. Dénaturation

Dans cette phase, l'ADN est subi à une température élevée de $95^\circ C$ ce qui permet aux brins de se séparer par la dissociation des liaisons hydrogène entre les paires de bases complémentaires de l'ADN double brin. La température est déterminée par la teneur en G+C des matrices d'ADN (Green et Sambrook 2019).

1.4.5.2. Hybridation ou anelage

Immédiatement après la dénaturation, la température se réduit à environ 50 à $65^\circ C$ ce qui permet aux amorces de se lier à l'extrémité 3' de chaque ADN simple brin. L'hybridation se produit uniquement au niveau des séquences complémentaires entre l'ADN matrice et les amorces. Cette liaison génère deux molécules doubles brins (Ghannam et Varacallo 2024; Khehra, Padda, et Swift 2024).

1.4.5.3. Extension, élongation ou amplification

Pour garantir l'activité de l'ADN polymérase, la température augmente à nouveau et devient comprise entre 75 et $80^\circ C$. L'ADN polymérase et à partir de l'ADN double brin lie les

nucléotides libres dans la direction 5' vers 3' pour synthétiser des nouveaux brins identiques à la matrice (Ghannam et Varacallo 2024).

Le nombre des molécules d'ADN copies augmente à chaque répétition de ces trois phases car la PCR a la capacité d'amplifier 10^6 à 10^9 copies d'ADN en peu de temps (Garibyan et Avashia 2013; Khehra, Padda, et Swift 2024).

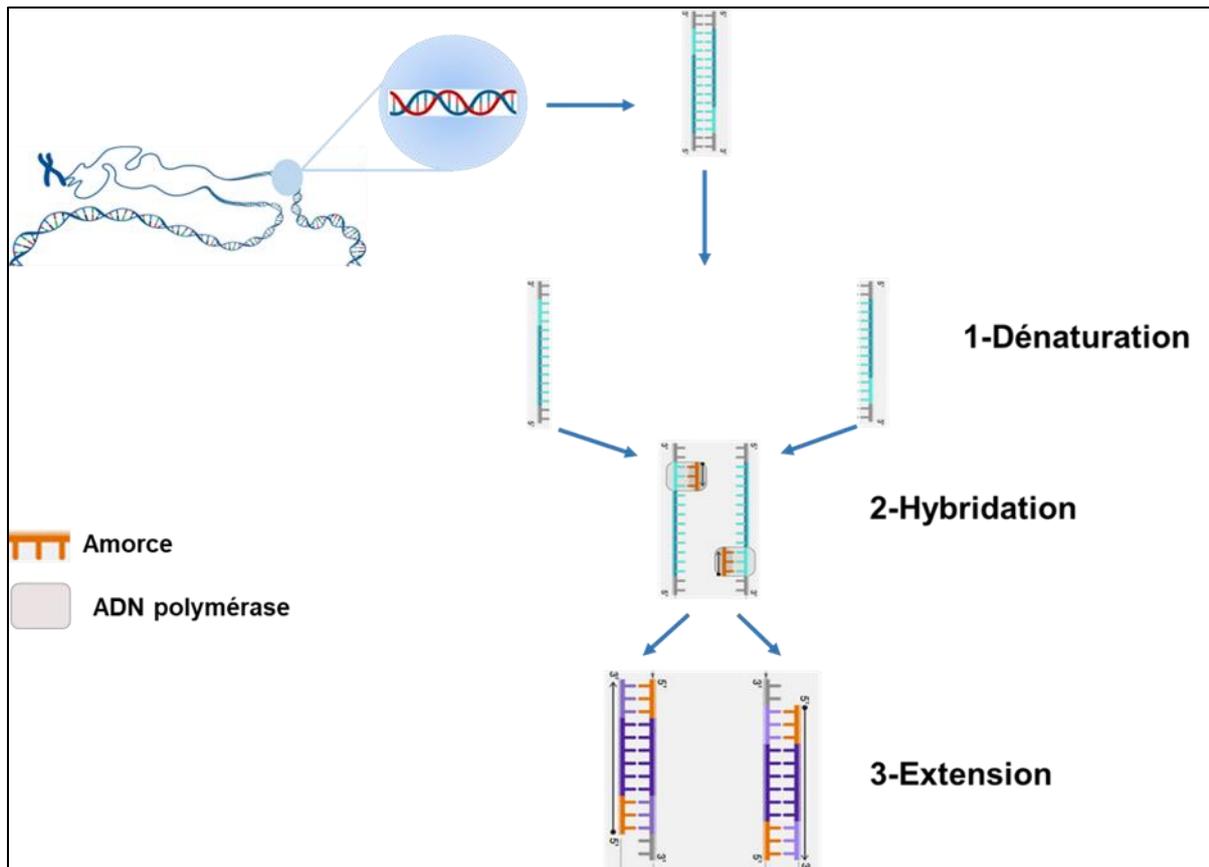


Figure 1.12. Procédure de la PCR (Garibyan et Avashia 2013).

1.4.6. Types de PCR

1.4.6.1. PCR en temps réel

La PCR en temps réel est une méthode alternative pour examiner de petits segments d'ADN *via* la durée raccourcie des cycles, l'élimination des étapes de manipulation procédurale post-PCR, la mise en œuvre de marqueurs fluorogènes, ainsi qu'une détection efficace des émissions. La PCR en temps réel est caractérisée par sa capacité à détecter rapidement les amplicons *via* la surveillance par marquage d'amorces et de molécules fluorogéniques constituées d'amplicons (Khehra, Padda, et Swift 2024).

1.4.6.2. PCR par transcriptase inverse-polymérase

La réaction en chaîne par transcriptase inverse-polymérase (RT-PCR, *reverse transcriptase* ou encore *RT*) est une procédure qui utilise l'ARNm pour l'amplification de l'ADN *via* l'ADN polymérase qui est exprimée par des rétrovirus constitués d'ARN complémentaires (ADNc). Elle est caractérisée par sa sensibilité, sa spécificité et sa rapidité élevée (Ghannam et Varacallo 2024) (Islam et Iqbal 2020).

1.4.6.3. La PCR multiplex

La PCR multiplex permet la mise en évidence de plusieurs cibles car la PCR s'effectue en même temps pour plusieurs couples d'amorces qui sont ajoutés dans un même tube (Lamoril et *al.* 2007).

Il existe plusieurs PCR avec différentes caractéristiques telles que la PCR classique, la nested-PCR, la PCR–Elisa, la PCR compétitive, la PCR numérique basée sur des gouttelettes (ddPCR) et la PCR numérique sur puce (cdPCR) (Lamoril et *al.* 2007) (Zhu et *al.* 2020).

1.5. Problématique et objectif

1.5.1. Problématique

Les ILCs de groupe 1 (ILCs1) sont des cellules innées résidentes dans les tissus et partagent de nombreuses caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles avec les lymphocytes T, notamment les Th1. Cette analogie permet aux ILCs1 d'assurer une réponse immunitaire de type 1 contre certaines bactéries pathogènes telles que *P. aeruginosa*. Ces cellules sont impliquées dans la régulation de l'inflammation des tissus, l'homéostasie et nécessitent l'expression de facteur de transcription T-bet qui contrôle le développement, la plasticité, l'activité cytotoxique et la maturation de ces cellules. Les NCR+ILCs3 ou NKp46+ ILCs3 sont un sous ensemble de la troisième population des cellules lymphoïdes innées et situés dans la lamina propria de l'intestin. Ces cellules sont nécessaires à la protection immunitaire intestinale et les réponses immunitaires. De plus, les NKp46+ILCs3 nécessitent également le facteur de transcription T-bet pour leur développement et pour l'expression de récepteur NKp46 sur leurs surfaces. Ce facteur permet l'induction de la prédisposition des NCR+ILCs3 vers une réponse de type 1. La suppression constitutive de T-bet empêche leur développement et provoque l'apparition des maladies inflammatoires des muqueuses.

L'étude de l'importance du gène *TBX21*, qui code pour le facteur de transcription T-bet nécessaire pour la sécrétion de l'IFN- γ et le déclenchement d'une réponse immunitaire contre les agents pathogènes intracellulaires par les ILC1s et les NCR+ILC3s nécessite

Chapitre 1. Revue de la littérature

l'utilisation de nombreuses techniques de la biologie moléculaire, telles que la PCR. La réussite de cette dernière nécessite l'utilisation d'une paire d'amorces spécifiques conçues à l'aide de l'outil PRIMER-BLAST.

1.5.2. Objective

L'objectif de ce travail consiste à l'élaboration des séquences d'oligonucléotides qui serviront d'amorces à l'amplification du gène *TBX21* par PCR.

1.5.3. But

Cette étude consiste à concevoir des amorces spécifiques au gène *TBX21* afin de déterminer son taux d'expression par les ILC1s et les NCR+ILCs3 au cours d'une infection bactérienne par *P. aeruginosa*.

Chapitre 2. Matériel et méthodes

2.1. Conception des amorces

La conception d'amorces est une étape cruciale lors de la réalisation de PCR pour choisir les bonnes amorces qui aident dans le ciblage et l'amplification d'une séquence nucléotidique cible (K. Li et Brownley 2010a).

De nombreux facteurs susceptibles de limiter le succès d'une paires d'amorces, tels que la création des dimères d'amorces, la formation des structures secondaires et les interférences Tige-boucle. Pour éviter ces problèmes, il faut utiliser des outils informatiques d'analyse de séquence pour sélectionner la meilleure paire d'amorce (K. Li et Brownley 2010a).

La sélection des amorces se fait selon des critères suivants :

➤ **La longueur de l'amorce**

La longueur optimale des amorces est généralement comprise entre 18 à 24 pb. Des amorces plus longues prendront plus de temps à s'hybrider et à s'étendre, produisant ainsi moins d'amplicons (Thornton et Basu 2011).

➤ **Température de fusion (T_m)**

C'est une valeur la plus critique pour réussir une expérience PCR. La température de fusion des amorces est généralement comprise entre 50 °C et 80 °C. Pour réaliser une PCR avec un succès, la différence de température de fusion d'une paire d'amorces ne doit pas dépasser 5 °C (K. Li et Brownley 2010b).

➤ **Teneur en Guanine (G) / Cytosine(C)**

Cette teneur est définie comme une valeur en pourcentage qui indique le rapport entre les nucléotides « G » et « C » qui apparaissent dans une amorce. Les amorces PCR efficace doivent maintenir un contenu GC raisonnable compris entre 40 et 60 %.

Pour fournir une fenêtre thermique suffisante pour un recuit efficace, une correspondance entre la température et le contenu GC est nécessaire (Dieffenbach, Lowe, et Dveksler 1993; Chuang, Cheng, et Yang 2013).

➤ **L'extrémité 3'**

L'extrémité 3' est très importante dans le processus PCR car elle est considérée comme le point de départ de l'extension (Nybo 2013). L'extrémité 3' des amorces doit contenir un G ou un C car les appariements de bases GC sont plus stables

thermodynamiquement que les appariements de bases adénine (A) et thymine (T) (Chuang, Cheng, et Yang 2013).

Afin d'éviter la formation de dimères d'amorce et de structures de boucles en épingle à cheveux, les extrémités 3' d'un ensemble d'amorces, qui comprend une amorce à brin positif et une amorce à brin négatif, ne doivent pas être complémentaires les unes des autres, et l'extrémité 3' d'une seule amorce ne peut pas non plus être complémentaire aux autres séquences de l'amorce (Lorenz 2012d).

➤ La spécificité

La spécificité garantit que l'amorce conçue peut détecter seulement une séquence cible spécifique et ne réapparaît pas dans la séquence matrice d'ADN ou la séquence génomique pour éviter des résultats de PCR invalides (Chuang, Cheng, et Yang 2013).

2.2. Conception des amorces pour amplifier le gène *TBX21*

2.2.1. Détermination de la séquence du gène *TBX21*

La conception des amorces encadrant le gène *TBX21* commence par la recherche de la séquence de référence du gène *TBX21*. On a utilisé la base de données « Ensembl » « www.Ensembl.org » qui est un système produit depuis plus de vingt ans, permettant de générer et de distribuer des annotations du génome comme les gènes, la variation, la génomique comparative à travers de tous les vertèbres et les organismes model clés (Cunningham et al. 2022 ; Martin et al. 2023). Cette base est utilisée pour connaître la séquence du gène *TBX21* (figures 2.1, 2.2 et 2.3).

The screenshot shows the Ensembl genome browser interface. The search bar is highlighted with a red box and contains the text "1. choisir l'espèce" above a dropdown menu set to "Human" and "2. écrire le gène indiquer" above the text "TBX21". A red arrow points to the "Go" button, labeled "3. cliquer sur GO". The page header includes "Ensembl genome browser 111" and "Aller sur plateforme d'Ensembl". The main content area features a search bar with the text "Search" and "Human" selected in the dropdown. Below the search bar, there are several sections: "Tools" (BioMart, BLAST/BLAT, Variant Effect Predictor), "Ensembl Release 111 (January 2024)" with a list of updates, and "All genomes" (Pig breeds, Mouse). The footer includes "Ensembl Rapid Release" information.

Chapitre 2. Matériels et méthodes

Figure 2.1. Plateforme de la base de données Ensembl. (1) spécifier l'espèce Humaine. (2) écrire le nom du gène *TBX21* puis (3) cliquer sur GO pour afficher les résultats du recherche (tous est encadrer en rouge).

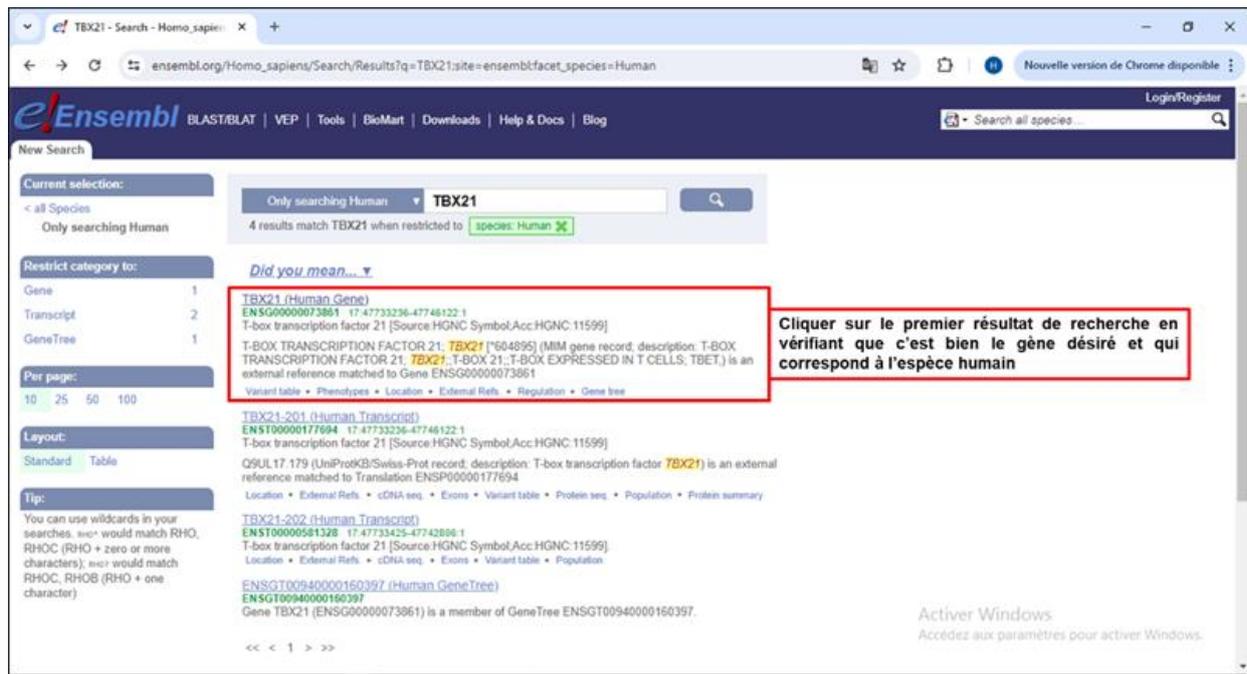


Figure 2.2. Résultats de la recherche du gène *TBX21*. Cliquer sur le premier résultat de recherche en vérifiant c'est bien le gène désiré et qui correspond à l'espèce humaine (encadrer en rouge).

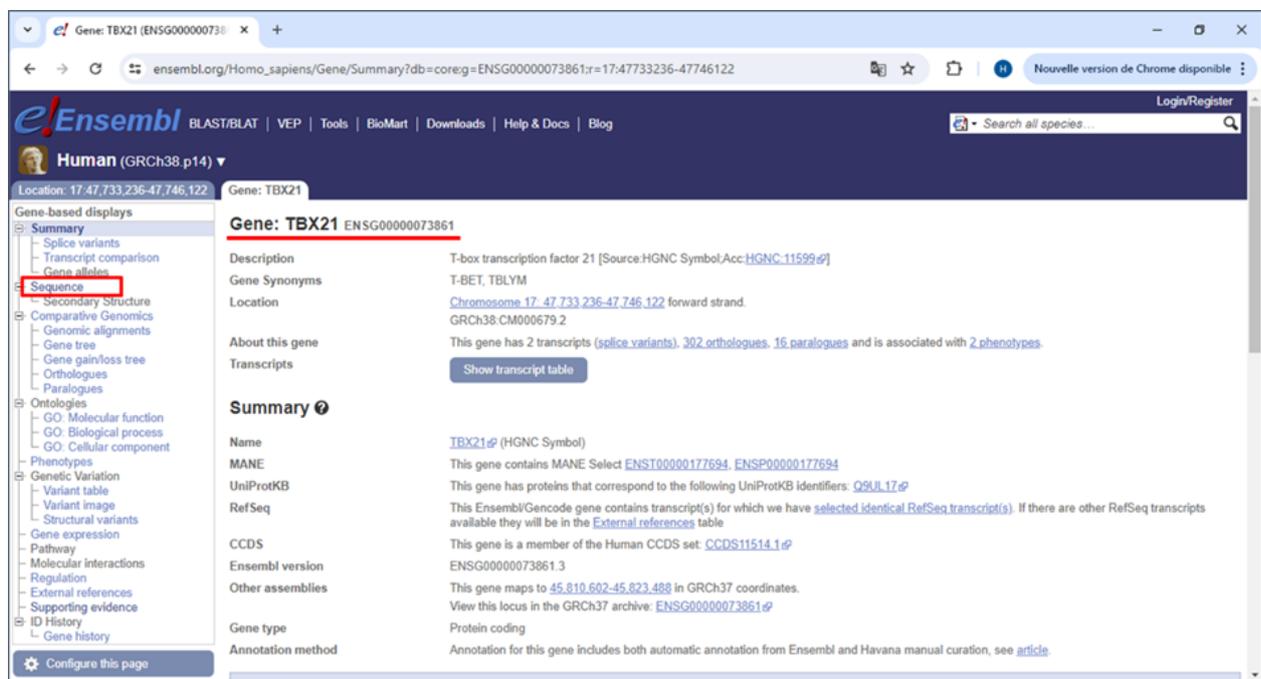
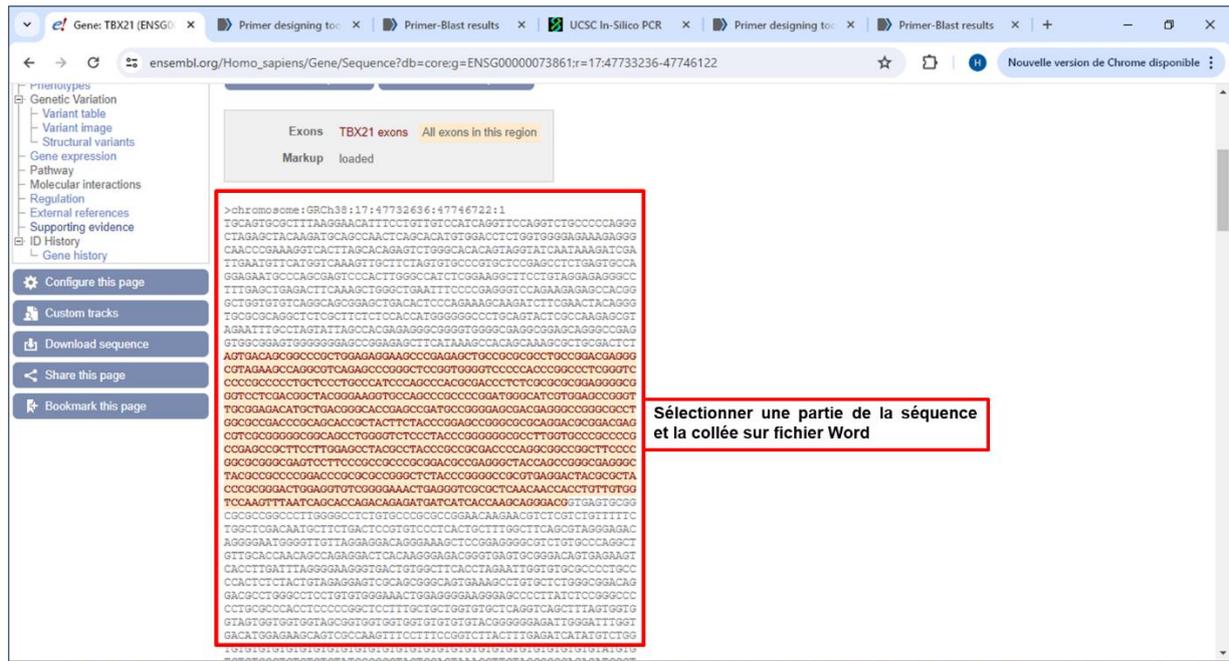


Figure 2.3. Les caractéristiques du gène *TBX21*. La plateforme Primer-BLAST montre les différentes caractéristiques du gène *TBX21*. Après il faut cliquer sur (Séquence) pour afficher la séquence du gène *TBX21* (encadrer en rouge).

La figure 2.4 présenter la séquence du gène *TBX21*. Tout ce qui est en rouge représentent les séquences codantes (exons), et les caractères en noir représentent les séquences non-codantes (introns).

Chapitre 2. Matériels et méthodes



ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Sequence?db=core&g=ENSG00000073861;r=17:4773236-47746122

Exons TBX21 exons All exons in this region

Markup loaded

```
>chr03:GRCh38:17:47732636:47746122:1
TGCAGTGGGCTTTAAGGAACATTTCTGTGTCCATCAGGTTCCAGGCTGCCGCCAGGG
CTAGAGCTACAAGATGCAGCCAACTCAGCACATGTGGACCTCTGGTGGGGAAGAGGGG
CAGCCGAAAGGTCCTTACGACAGAGCTGGGACAGACTAGGATCAATAGATCSA
TTGAAATTTCAAGTCAAGTCTCTTCAAGTGGCCCTGGCCAGGCTTGAAGTCCA
GGAAATGCCAGCAGTCCCACTTGGGCCATCTCCGAAGGCTTCTGTAGGAGAGGCC
TTTGAAGCTGAGACTTCAAAGCTGGGCTGAATTTCCCGAGGGTCCAGAGAGAGCCAGGG
GCTGGTGTGTGAGGAGGAGCTGACACTCCAGAAAGCAAGATCTTGAAGTACAGGG
TGCAGCAGGCTCTGCTTCTTCCACATGGGGGCTGCACTACTGCGCAAGAGGCT
AGAAATTTGCTAGTATTAGCACAAGAGGCGGGGTTGGGCGAGGCGAGCGGCGAG
GTGGGAGTGGGGGAGCCGGAGGCTTCAAAAGCCACAGCAAGGCTTGGAGCTCT
AGTGAAGGCGGCGCTGGAGGAGAGCCGAGAGCTGCGCGGCGCTGCCGAGCAGGG
CCTGAAGCCAGGCTCAGAGCCGCGCTCCGCTGGGCTCCCGCACCGGCGCTCGGTC
CCCCCGCCCTCTCCCTGCCATCCAGCCACCGGAACCTCTCCGCGCGAGGGCG
GGTCTCGAGGCTACGGAAGTCCAGCCCGCCCGATGGGATGGGATCGGAGCGGGT
TCCGAGACATCTGACCGGCAAGCCGCTCCCGGAGCGAGCCAGCGCGCGGCTCT
GGCCCGACCGCAGCCCTACTTCTACCGAGCCGGGCGCGAGAGCGGAGCAG
CGTCCGCGGGGCGAGGCTGGGCTCCCTACCCGCGGGGCGCTTGTGCCCGCCG
CGAGCGGCTTCTTGAAGCTACGCTACCCGCGGAGCCAGGCGCGGCGCTTCCCG
GGCGGGCGAGTCTTCCCGCGCCCGGAGCCGAGGCTACCGCGGGCGAGGGCG
TACCGCCCGGAGCCCGCGCGCGGCTTACCCGGGCGCGTGAAGACTACCGCTA
CCCGCGACTGGAGGCTCCGGAAGCTGAGGCTCCCGCTCAACAGCAGCTTGTGG
TCCAGTTAATCAGCAGCAGAGATGATCATCCACAGAGGAGCGTGGAGTGGG
CGCGCGGCGCTTGGGCGCTTGTGCCCGCGGAGCAAGAACTCTGCTGTGTTTTT
TGGCTCGAATGCTTCTGACTCGTCTCCCTCACTGCTTGGCTTCAAGTAGGAGAC
AGGGAAATGGGTTGTAGAGGACAGGAAAGCTCCGAGGGGCGCTGTGGCCAGGCT
GTTCCACACAGCCAGAGGACTCAGAGGAGAGCGGTTGATGGGCGAGTGAAGAGT
GACCTTATTTAGGGAAAGGTTGCTTGGCTTCACTAGATTTGGTGGCGGCTTCCG
CCACTCTACTGTAGAGAGTCCAGCGGCGAGTGAAGCTTGTCTTGGGCGAGCAG
GACGCTGGGCTCTGTGGGAACTGGAGGGGAGGAGCCCTTATCTCCGGGCC
CCTGGCCCACTCCCGGCGCTTGTGCTGGTGTGCTCAGTCAAGTCTTGAAGTGGT
GTAGTGGTGGTGAAGGTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
SACATGGAGAGCAGTCCGCAAGTTTCTTCCGGTCTTACTTTGAGATCATAGTCTGG
```

Sélectionner une partie de la séquence et la collée sur fichier Word

Figure 2.4. La séquence du gène *TBX21* par la plateforme « Ensembl ». Sélectionner une partie de la séquence et la copier dans un document Word.

Pour faciliter la recherche des amorces spécifiques du gène *TBX21*, qui comporte les introns et les exons, comme montré dans cette figure, il faut sélectionner une partie avant l'exon de la séquence et une partie après l'exon et ensuite encadrer la région d'intérêt (figure 2.5).



Document5 - Word

Fichier Accueil Insertion Création Disposition Références Publipostage Révision Affichage Zotero WPS PDF Dites-nous ce que vous voulez faire... Connexion Partager

```
GGAAATGCCAGCAGTCCCACTTGGGCCATCTGGAAAGGCTTCTGTAGGAGAGGGCC
TTTGAAGCTGAGACTTCAAAGCTGGGCTGAATTTCCCGAGGGTCCAGAGAGAGCCAGG
GCTGGTGTGTGAGGAGGAGCTGACACTCCAGAAAGCAAGATCTTGAAGTACAGGG
TGCAGCAGGCTCTGCTTCTTCCACATGGGGGCTGCACTACTGCGCAAGAGGCT
AGAAATTTGCTAGTATTAGCACAAGAGGCGGGGTTGGGCGAGGCGAGCGGCGAG
GTGGGAGTGGGGGAGCCGGAGGCTTCAAAAGCCACAGCAAGGCTTGGAGCTCT
AGTGAAGGCGGCGCTGGAGGAGAGCCGAGAGCTGCGCGGCGCTGCCGAGCAGGG
CCTGAAGCCAGGCTCAGAGCCGCGCTCCGCTGGGCTCCCGCACCGGCGCTCGGTC
CCCCCGCCCTCTCCCTGCCATCCAGCCACCGGAACCTCTCCGCGCGAGGGCG
GGTCTCGAGGCTTACGGAAGTCCAGCCCGCGCTCCCGGAGTGGGATGGTGGAGCGG
TGCAGCAGTCTTCAAGGCTTCCAGGCTTCCCGGAGCGAGGAGGCGCGGCGCT
GGCCCGGAGCCGAGGCTTCAAGTCTTGAAGGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGAG
GTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
TACCGCCCGGAGCCCGCGCGCGGCTTACCCGGGCGCGTGAAGACTACCGCTA
CCCGCGACTGGAGGCTCCGGAAGCTGAGGCTCCCGCTCAACAGCAGCTTGTGG
TCCAGTTAATCAGCAGCAGAGATGATCATCCACAGAGGAGCGTGGAGTGGG
CGCGCGGCGCTTGGGCGCTTGTGCCCGCGGAGCAAGAACTCTGCTGTGTTTTT
TGGCTCGAATGCTTCTGACTCGTCTCCCTCACTGCTTGGCTTCAAGTAGGAGAC
AGGGAAATGGGTTGTAGAGGACAGGAAAGCTCCGAGGGGCGCTTGTGCCCGCCG
GTTCCACACAGCCAGAGGACTCAGAGGAGAGCGGTTGATGGGCGAGTGAAGAGT
```

Exon

Intron

Sélectionner quatre ligne avant l'exon et quatre ligne après l'exon et encadrer cette séquence.

Figure 2.5. La séquence d'intérêt.

2.2.2. Le design des Primers : L'outil Primer-BLAST

PRIMER-BLAST est un outil public utiliser pour concevoir des amorces spécifiques à un gène cible. Cet outil est disponible sur le site « <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> » du « National Center for Biotechnology Information » (NCBI). Donc, on utilise PRIMER-BLAST pour la conception des amorces spécifique du gène *TBX21* (Ye et al. 2012).

Les étapes suivies pour utiliser cet outil sont présentées dans les figures ci-dessous :

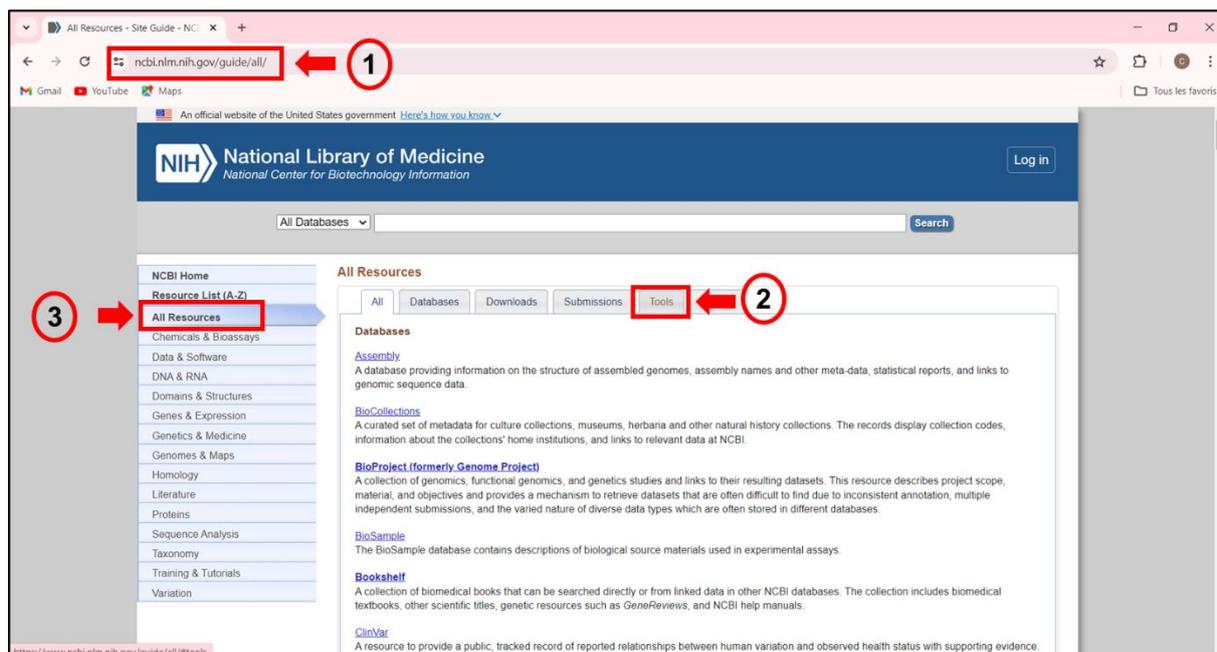


Figure 2.6. Le site NCBI. 1- Aller sur la plateforme NCBI. 2- Cliquer sur « All Resources » puis 3- Cliquer sur « Tools ».

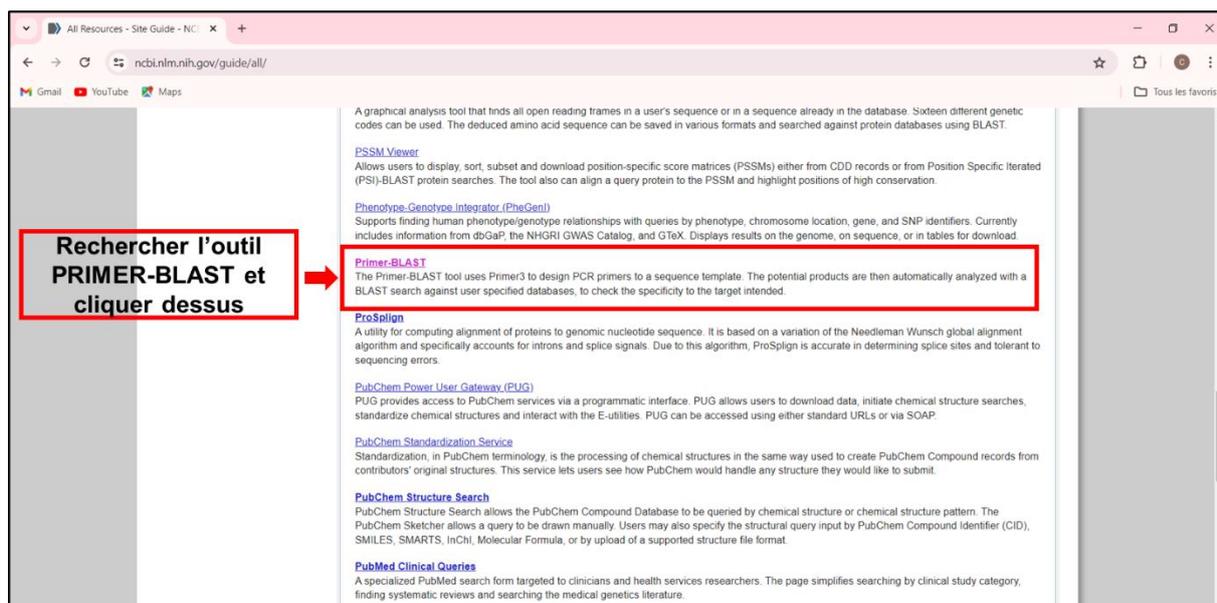


Figure 2.7. L'outil PRIMER-BLAST.

Chapitre 2. Matériels et méthodes

1 → Primer-BLAST

2 → Enter accession, gi, or FASTA sequence

3 → Forward primer: 1, Reverse primer: 1200

Figure 2.8. L'outil PRIMER-BLAST. 1- La page du logiciel s'affichera comme dans la figure dessus, 2- Copier le format FASTA de la séquence d'intérêt encadrer dans le document Word puis la coller dans la case « Entrer accession, gi, or FASTA sequence » et supprimer les espaces entre les lignes, 3- On détermine les amorces sens et antisens (Forward et Reverse primers).

1 → Genomes for selected eukaryotic organisms (primary assembly only)

2 → Homo sapiens

3 → Show results in a new window

4 → Get Primers

Figure 2.9. Paramètres de vérification de la spécificité des paires d'amorces (Primer Pair Specificity Checking Parameters). 1- Sélectionner la case où s'est écrit « RefSeq mRNA » et choisir « Genomes for selected oraganisms », 2- Vérifier l'espèce que c'est bien « Homo sapiens », 3- Cocher la case « Show results in a new window » pour que les résultats s'afficheront dans une nouvelle fenêtre, ensuite, 4- cliquer sur « Get Primers » pour afficher les résultats.

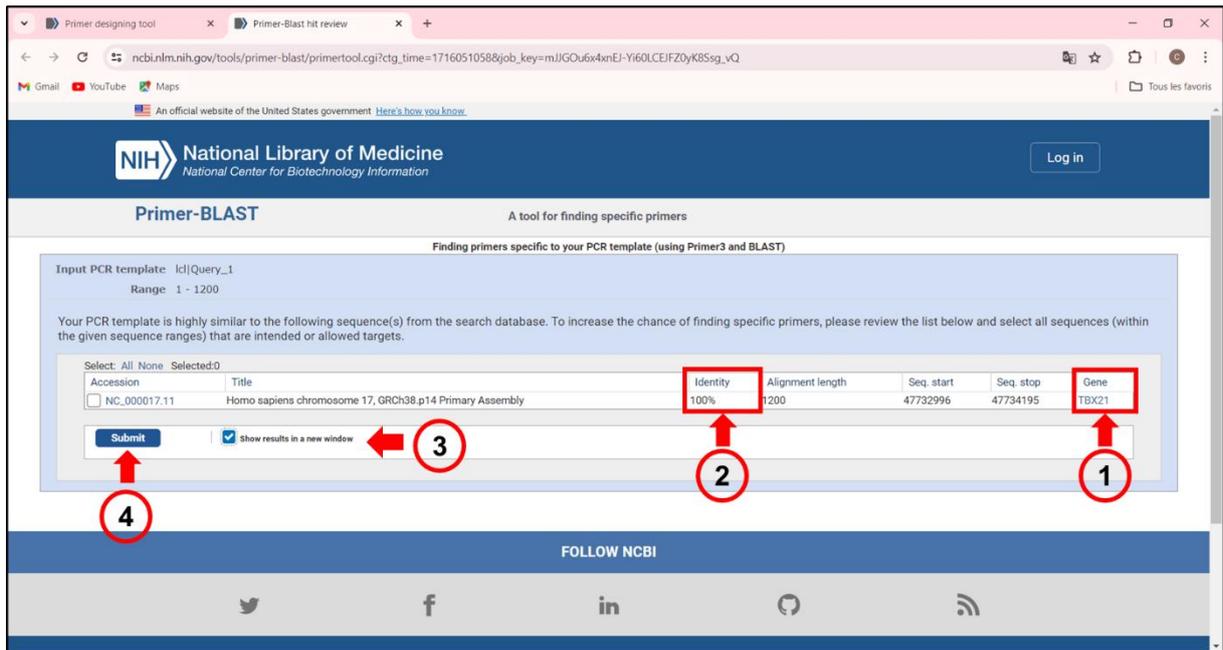


Figure 2.10. Recherche d'amorces spécifiques à votre modèle PCR « Finding primers specific to your PCR template ». 1- Vérifier que le gène est *TBX21*. 2- Assurer que l'identité est 100%. 3- Cocher la case « Show results in a new window » pour que les résultats s'affichent dans une nouvelle fenêtre. 4- Cliquer sur « Submit » pour obtenir les amorces.

2.2.3. Confirmation des résultats par *In-Silico* PCR

L'analyse *In-Silico* PCR (PCR virtuelle) est une méthode complémentaire utile et efficace pour garantir la spécificité des amorces pour une large gamme d'applications PCR. Cette méthode se fait par un programme dans la plateforme « genome.ucsc.edu » (figure 2.11 et figure 2.12).

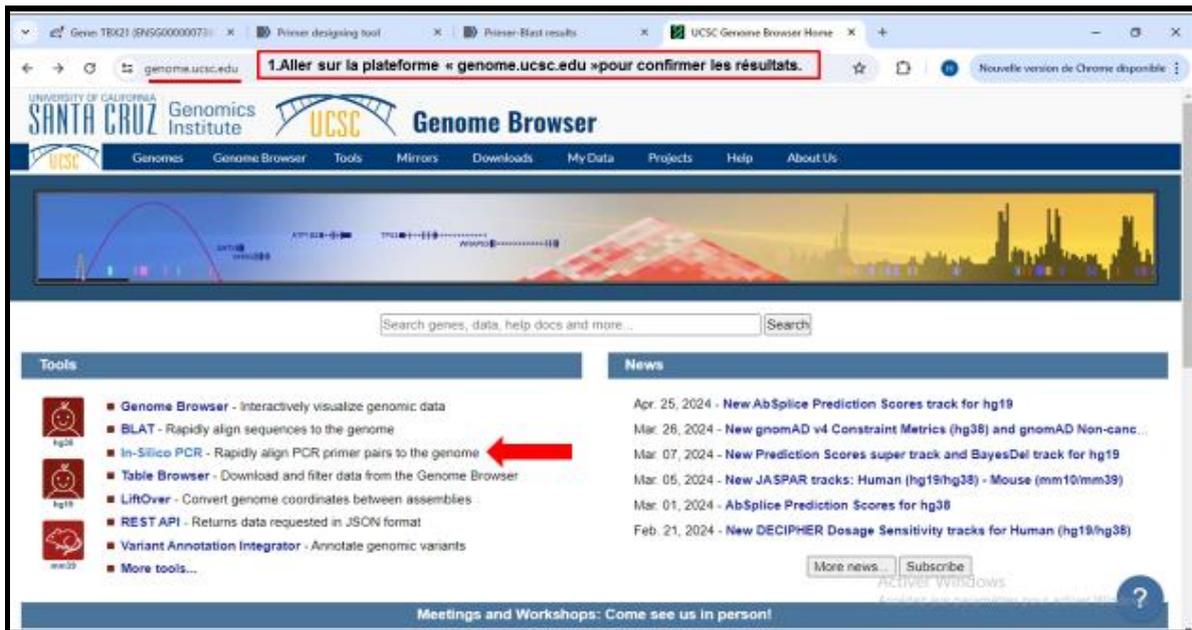


Figure 2.11. Plateforme du site « genome.ucsc.edu ». Confirmation des résultats par la plateforme « UCSC genome browser ». (1) Aller sur la plateforme « UCSC genome browser », ensuite (2) cliquer sur « *in Silico* PCR ».

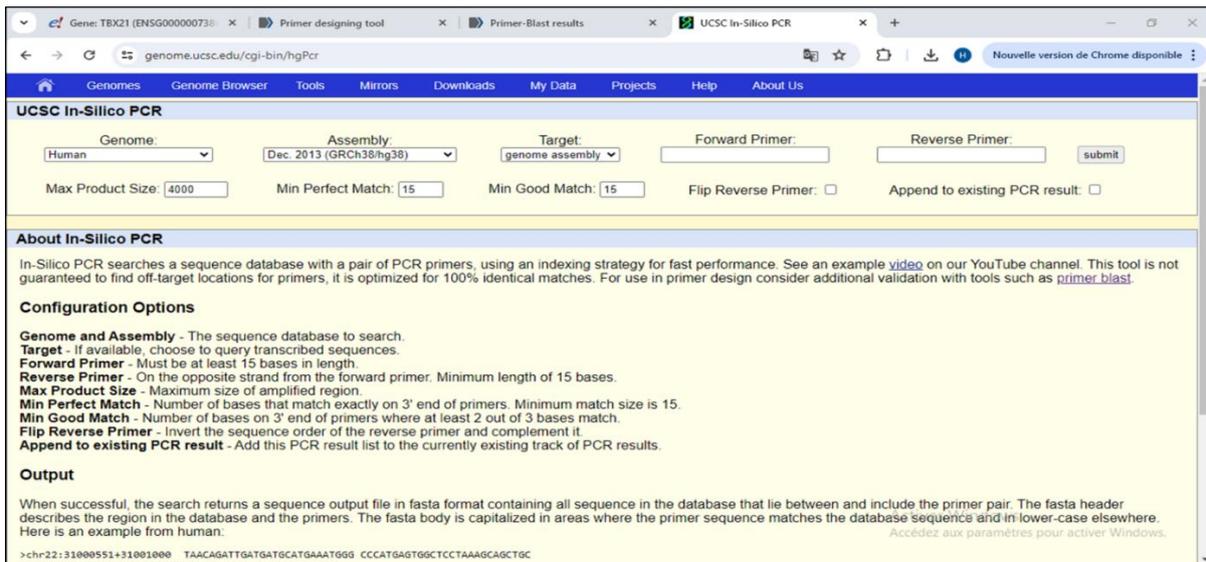


Figure 2.12. Le site *In-Silico* PCR.

Chapitre 3. Résultats

3.1. Résultats de la conception des amorces

3.1.1. Résultats du Primer-BLAST

La conception des amorces spécifiques du gène *TBX21* a passé par plusieurs étapes. Tout d'abord, nous avons utilisé le site « Ensembl » pour avoir l'intégrité du gène *TBX21*. Ce gène se compose de 6 exons. Dans cette étude, nous avons choisi le premier exon. Ensuite, nous utilisons l'outil Primer-Blast sur la base de données « NCBI ». Ce dernier nous permet d'avoir 10 paires d'amorces propres au gène *TBX21* spécifique de l'exon 1.

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 3.1.

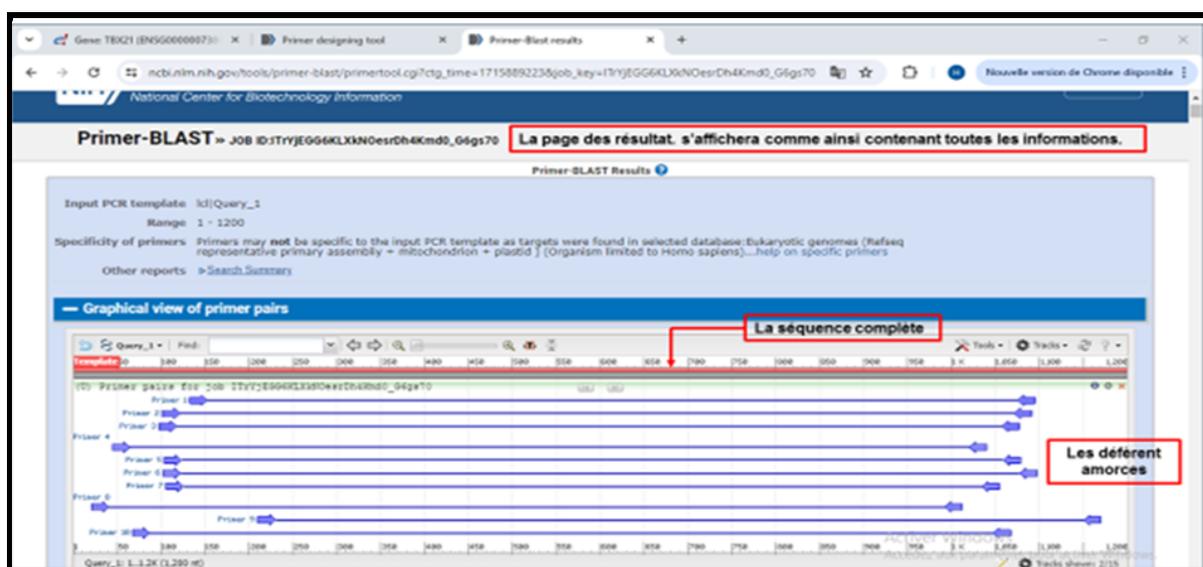


Figure 3.1. Résultats du Primer-BLAST.

Nous avons choisi la troisième paire d'amorces « Primer paire 3 », quatrième paire d'amorce « Primer paire 4 », cinquième paire d'amorce « Primer paire 5 » et les raisons suivantes :

- Les tailles de nos paires d'amorces choisies sont de (980, 976,996 paires de bases, respectivement) (Figure 3.2,3.3,3.4). Cette taille est comprise entre 250 à 1000 paires bases. Le respect de ce critère est important à fin d'éviter le phénomène de saturation. En effet, plus la taille de l'amorce est supérieure à 1000 paires de bases, plus l'amorce devient difficile à amplifier.
- Pour de meilleurs résultats d'hybridation, l'amorce a besoin d'une température entre 50°C à 80°C (cette température correspond à une longueur de l'amorce de 18-24 bases). Nos paires répond parfaitement à ce critère car sa température correspond 60°C (Figure 3.2).
- La longueur des amorces est proportionnelle à l'efficacité de l'hybridation. De plus, la température d'hybridation doit être optimale pour une longueur d'amorce entre 18 à

Chapitre 3. Résultats

24 bases. Dans ce cas, nous avons choisi 3 paires d'amorces d'une taille de 20 nucléotides (Figure 3.2,3.3,3.4). Plus l'amorce est longue, moins l'hybridation est efficace.

- Enfin, la teneur en GC pour pair d'amorce 3 est de 50% et 60% pour l'amorce sens et anti-sens respectivement, pour primer pair 4 est de 55% et 50% pour Forward et Réserve primer respectivement et la dernière est de 55% pour les deux paires d'amorce. La teneur en GC d'une amorce doit être comprise entre 40% et 60 %.

Primer pair 3									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCTGCAGTACTCGCCAAGAG	Plus	20	98	117	60.46	60.00	6.00	2.00
Reverse primer	TCCCTACGCTGAAGCCAAAG	Minus	20	1077	1058	60.04	55.00	4.00	2.00
Product length	980								

Figure 3.2. Primer pair 3.

Primer pair 4									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TCTTCGAACTACAGGGTGCG	Plus	20	45	64	59.76	55.00	6.00	2.00
Reverse primer	TCAGAAAGCATTGTCGAGCCA	Minus	20	1040	1021	59.68	50.00	4.00	2.00
Product length	996								

Figure 3.3. Primer pair 4.

Primer pair 5									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GTACTCGCCAAGCGTAGA	Plus	20	104	123	59.27	55.00	4.00	0.00
Reverse primer	CTCCCTACGCTGAAGCCAAA	Minus	20	1078	1059	60.04	55.00	4.00	0.00
Product length	975								

Figure 3.4. Primer paire 5.

Le tableau 3.1 représente une comparaison entre les critères d'une bonne amorce et nos amorces.

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

Chapitre 3. Résultats

Paires d'amorces	Les critères							
	Longueur (Lengh)		Température de fusion (Tm)		Teneur en GC (GC%)		Produit spécifique	Produit aspécifique
	Taux optimale							
	18 à 35 bases nucléotidiques		50 et 80 °C		40 à 60		Inférieur à 1000pb	Supérieur à 1000pb
	Amorce sens	Amorce anti-sens	Amorce sens	Amorce anti-sens	Amorce sens	Amorce anti-sens		
3	20	20	60.46	60.04	60	55	980	Tous plus de 1000pb
4	20	20	59.76	59.68	55	50	996	Tous plus de 1000pb
5	20	20	59.27	60.04	55	55	975	Tous plus de 1000pb

The screenshot shows the PRIMER-BLAST results page. The browser address bar indicates the URL: `ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primerblast.cgi?ctg_time=17160511098&job_key=rqRwDbNLvuOZ257ct7wK7lMrG9x0tADBdQ`. The page displays the following information:

- Primer pair 3:** Forward primer: CCTGCAGTACTGCCAAGAG (Length: 20, Tm: 60.46, GC%: 60.00); Reverse primer: TCCCTACGCTGAAGCAAAG (Length: 20, Tm: 60.04, GC%: 55.00). Self-complementarity values are 6.00 and 4.00 respectively.
- Products on potentially unintended templates:**
 - Product 1:** NC_000017.1 Homo sapiens chromosome 17, GRCh38.p14 Primary Assembly. Product length = 980. Features associated with this product: t-box transcription factor *tbx21*.
 - Product 2:** NC_000007.14 Homo sapiens chromosome 7, GRCh38.p14 Primary Assembly. Product length = 1530. Features associated with this product: iq domain-containing protein e isoform 1 and iq domain-containing protein e isoform 7.

Figure 3.5. Résultat de PRIMER-BLAST. 1-Vérifier la longueur des amorces, leurs températures d'hybridation et le rapport GC%, 2- vérifier que l'espèce est « Homo sapiens » et que le chromosome est du gène voulu, 3- vérifier la longueur du produit spécifique (< 1000pb), 4- s'assurer que toutes les produits aspécifiques ont une longueur de > 1000pb.

Chapitre 3. Résultats

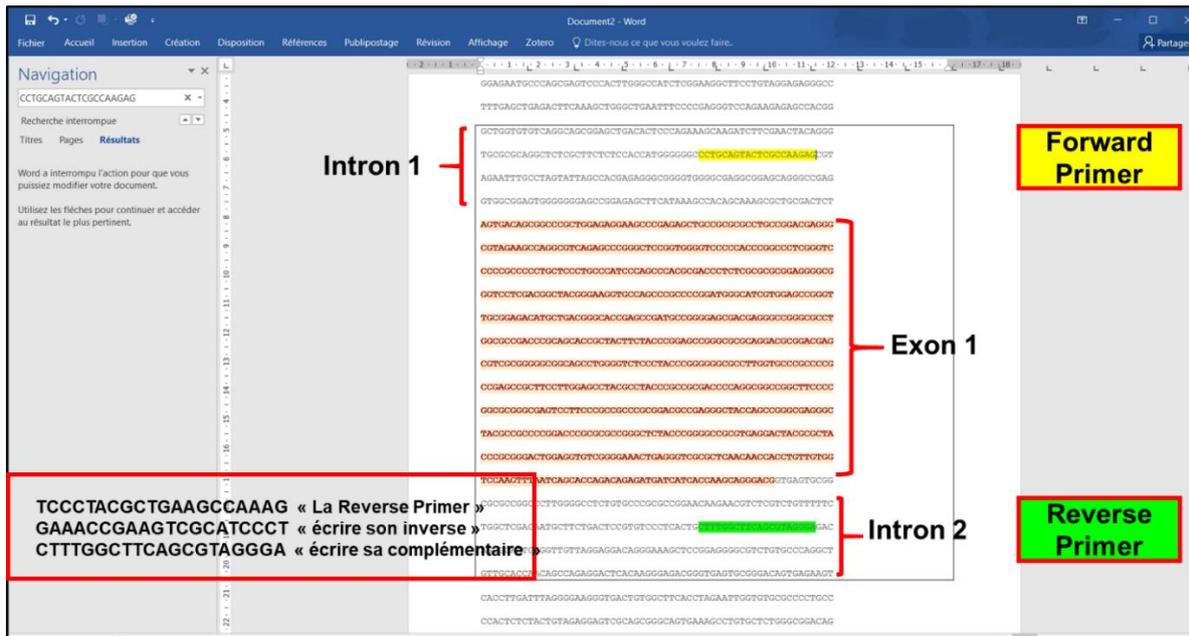


Figure 3.6. Les amorces encadrant la région d'intérêt. La Paire d'amorces N°3 (en jaune et vert) encadrant la partie de la séquence de l'ADN qu'on veut amplifier du gène *TBX21* ; Forward Primer (amorce sens) (CCTGCAGTACTCGCCAAGAG), Reverse Primer (amorce anti-sens) (CTTTGGCTTCAGCGTAGGGA).

3.1.2. Résultats d'*in-silico* PCR

Les résultats obtenus nous ont confirmés la taille du produit spécifique obtenus 980 pb ainsi que la spécificité des amorces conçues, les informations obtenues confirment aussi le chromosome 17 porteur du gène *TBX21*, la séquence des amorces et la température d'hybridation (Figure 3.7). Donc, ce résultat nous confirme la fiabilité des amorces que nous avons choisies.

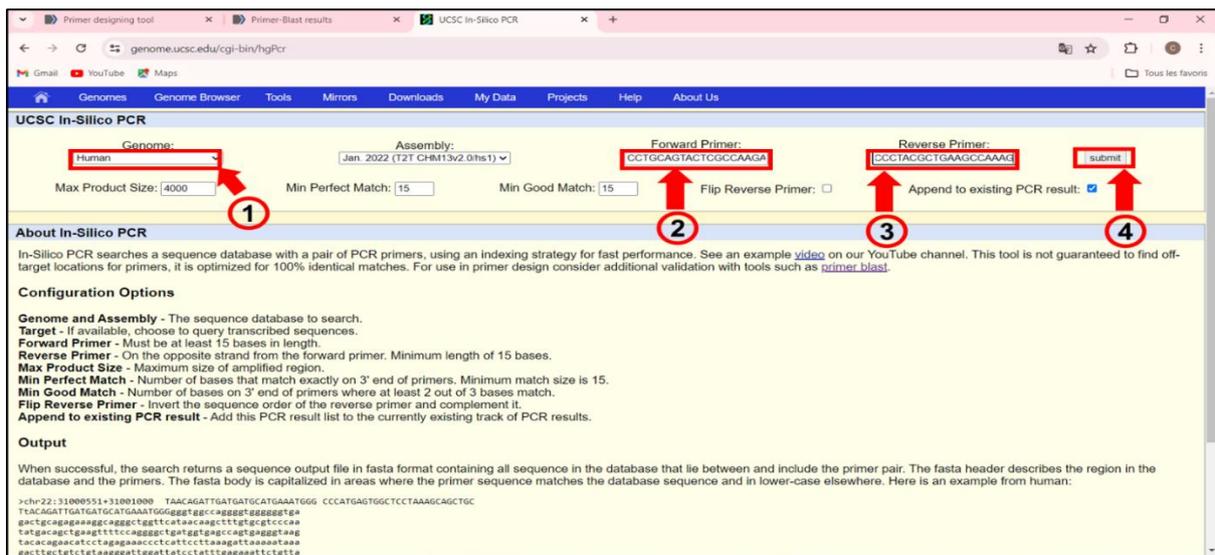


Figure 3.7. Confirmation des résultats sur la plateforme « UCSC genome browser ». 1- s'assurer que l'espèce est « Human », 2- Entrer l'amorce sens dans la case « Forward Primer », 3- Entrer l'amorce anti-sens dans la case « Reverse Primer » et (4) Cliquer sur « Submit ».

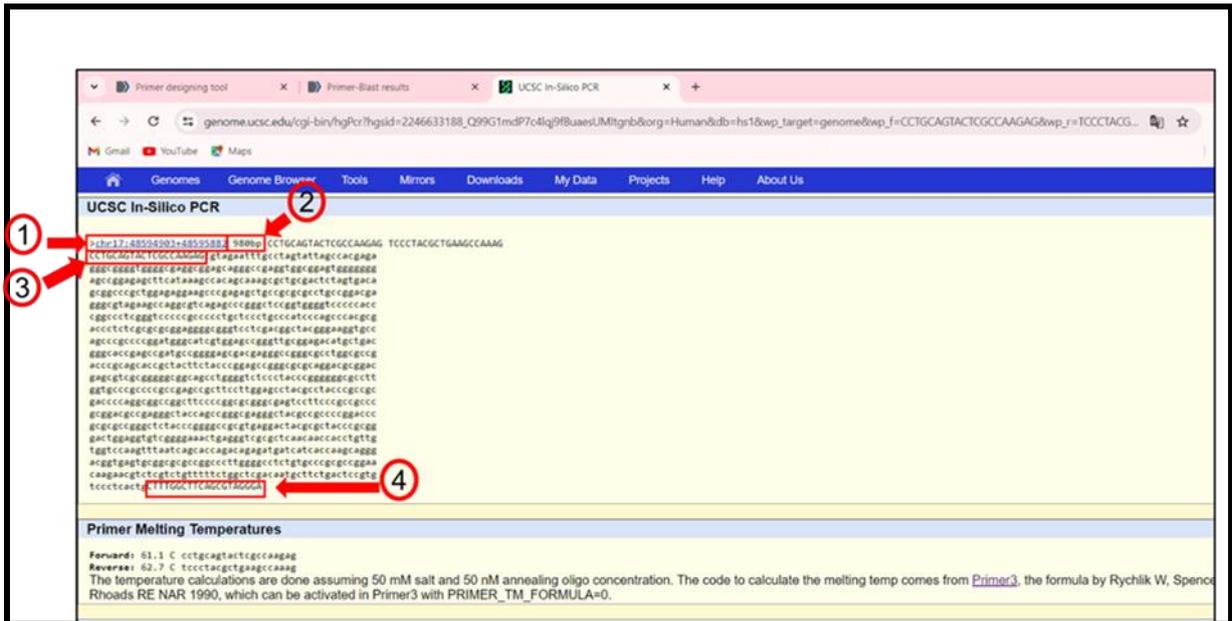


Figure 3.8. Résultats de la confirmation de la troisième paire d'amorce. Un seul résultat est affiché comme en dessus, 1 ,2-vérifier si la taille et le chromosome sont les mêmes que ceux du gène *TBX21*. 3,4- S'assurer que la paire d'amorce est la même que celle que nous avons choisie.

On a suivi les mêmes étapes de la conformation des résultats du troisième paire d'amorce pour obtenir les résultats de quatrième et cinquième paire d'amorce.

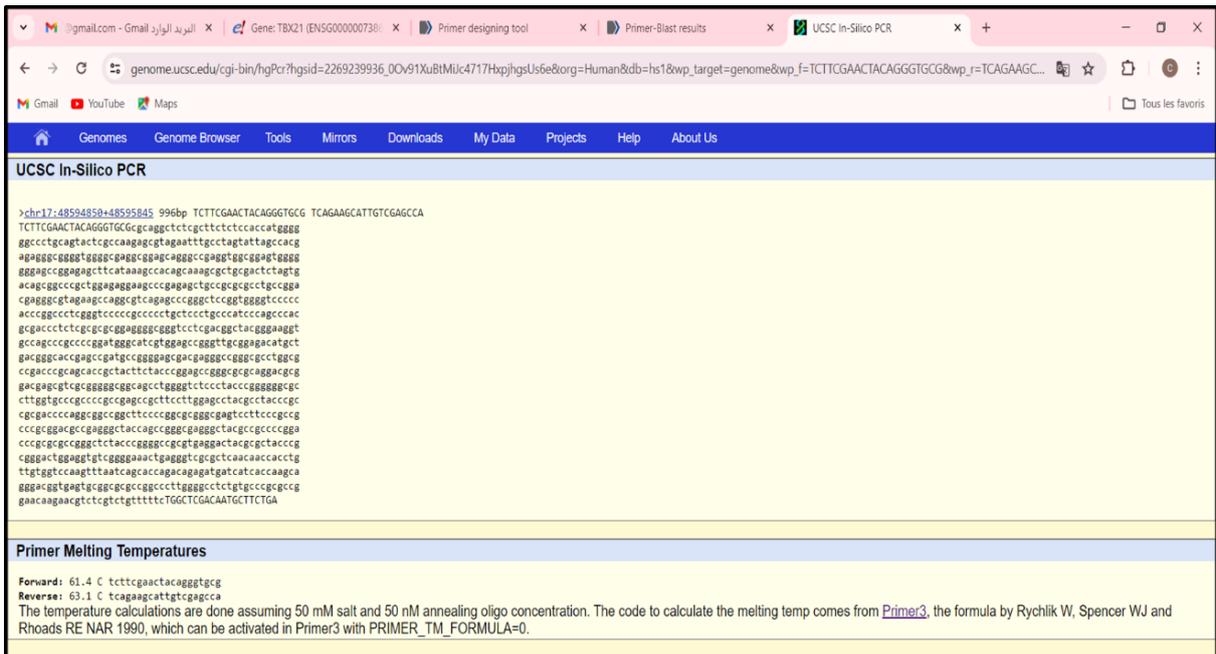


Figure 3.9. Résultats de la confirmation de la quatrième paire d'amorce.

Chapitre 4. Conclusion et perspectives

Les ILCs sont une population cellulaire nouvellement décrite du système immunitaire innée. Ces cellules sont caractérisées par une morphologie lymphoïde et un profil de cytokines similaires à celles des lymphocytes T. On distingue trois principaux groupes d'ILC. Les ILCs de type 1, divisé en 3 population (les NKC, Les ILC1s intraépithéliales, ILC1s), sont définies par la production des cytokines de type 1 et l'expression de facteur de transcription T-bet. Les ILCs de type 2 secrètent l'IL-5, IL-10, IL-9, IL-13 et sont caractérisées par GATA3. Les ILCs3 constituées des cellules ILCs3 NKp46 et les LTI, elles sont capables de produire l'IL-17, IL-22 et expriment ROR γ t.

Le facteur de transcription T-bet est un élément clé associé au développement des ILCs1 et la plasticité des NKP46+ILCs3 productrices d'IFN γ . Ce facteur joue un rôle crucial dans l'immunité de type 1 et dans la résistance à de nombreuses infections bactériennes notamment celles par *Pseudomonas aeruginosa*. Grâce à ce rôle, il s'avère important d'étudier l'expression du gène *TBX21*, qui code pour T-bet, dans divers processus immunologiques.

Pour amplifier notre gène par PCR, il fallait d'abord accéder à la séquence génomique. Ensuite, cette séquence a été utilisé pour élaborer un couple d'amorces spécifiques encadrant une région d'intérêt au niveau de l'exon 1 du gène *TBX21* à partir de l'outil PRIMER-BLAST.

Les trois paires d'amorces choisies répondent à tous les critères de choix de bonnes amorces. Leur taille est comprise entre 250 à 1000, la température de fusion est comprise entre 50°C et 80°C, la longueur est de 20 nucléotides et la teneur en GC est comprise entre 40 % et 60 %.

Grâce à ce travail, on a découvert les différents outils du domaine bio-informatique tels que la recherche de séquence génomique dans les bases de données comme « Ensembl », la conception des amorces spécifiques grâce aux logiciels informatiques tels que « PRIMER-BLAST » et ainsi connaître les caractéristiques fondamentales au bon choix d'amorces pour le bon déroulement d'une PCR.

Chapitre 5. Bibliographie

Addison, W. 1843. « Experimental and Practical Researches on the Blood: Second Series ». *BMJ* s1-6 (152): 444-45. <https://doi.org/10.1136/bmj.s1-6.152.444>.

Álvarez-Fernández, Rubén. 2013. « Explanatory Chapter ». In *Methods in Enzymology*, 529:1-21. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00001-X>.

Artis, David, et Hergen Spits. 2015a. « The Biology of Innate Lymphoid Cells ». *Nature* 517 (7534): 293-301. <https://doi.org/10.1038/nature14189>.

———. 2015b. « The Biology of Innate Lymphoid Cells ». *Nature* 517 (7534): 293-301. <https://doi.org/10.1038/nature14189>.

Bal, Suzanne M, Jochem H Bernink, Maho Nagasawa, Jelle Groot, Medya M Shikhagaie, Kornel Golebski, Cornelis M Van Drunen, 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 ». *Nature Immunology* 17 (6): 636-45. <https://doi.org/10.1038/ni.3444>.

Bal, Suzanne M., Korneliusz Golebski, et Hergen Spits. 2020. « Plasticity of Innate Lymphoid Cell Subsets ». *Nature Reviews Immunology* 20 (9): 552-65. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0282-9>.

Belz, Gabrielle T. 2016. « ILC2s Masquerade as ILC1s to Drive Chronic Disease ». *Nature Immunology* 17 (6): 611-12. <https://doi.org/10.1038/ni.3467>.

Bernink, Jochem H., Yoichiro Ohne, Marcel B. M. Teunissen, Jingya Wang, Jincheng Wu, Lisette Krabbendam, Christine Guntermann, et al. 2019. « C-Kit-Positive ILC2s Exhibit an ILC3-like Signature That May Contribute to IL-17-Mediated Pathologies ». *Nature Immunology* 20 (8): 992-1003. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0423-0>.

Bernink, Jochem H, Charlotte P Peters, Marius Munneke, Anje A Te Velde, Sybren L Meijer, Kees Weijer, Hulda S Hreggvidsdottir, et al. 2013a. « Human Type 1 Innate Lymphoid Cells Accumulate in Inflamed Mucosal Tissues ». *Nature Immunology* 14 (3): 221-29. <https://doi.org/10.1038/ni.2534>.

———. 2013b. « Human Type 1 Innate Lymphoid Cells Accumulate in Inflamed Mucosal Tissues ». *Nature Immunology* 14 (3): 221-29. <https://doi.org/10.1038/ni.2534>.

Bernink, Jochem H., Lisette Krabbendam, Kristine Germar, Esther de Jong, Konrad Gronke, Michael Kofoed-Nielsen, J. Marius Munneke, et al. 2015. « Interleukin-12 and -23 Control Plasticity of CD127+ Group 1 and Group 3 Innate Lymphoid Cells in the Intestinal Lamina Propria ». *Immunity* 43 (1): 146-60. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.06.019>.

Bibliographie

- Boos, Markus D., Yoshifumi Yokota, Gerard Eberl, et Barbara L. Kee. 2007. « Mature Natural Killer Cell and Lymphoid Tissue-Inducing Cell Development Requires Id2-Mediated Suppression of E Protein Activity ». *The Journal of Experimental Medicine* 204 (5): 1119-30. <https://doi.org/10.1084/jem.20061959>.
- Breidenstein, Elena B.M., César De La Fuente-Núñez, et Robert E.W. Hancock. 2011. « Pseudomonas Aeruginosa: All Roads Lead to Resistance ». *Trends in Microbiology* 19 (8): 419-26. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005>.
- Buonocore, Sofia, Philip P. Ahern, Holm H. Uhlig, Ivaylo I. Ivanov, Dan R. Littman, Kevin J. Maloy, et Fiona Powrie. 2010. « Innate Lymphoid Cells Drive Interleukin-23-Dependent Innate Intestinal Pathology ». *Nature* 464 (7293): 1371-75. <https://doi.org/10.1038/nature08949>.
- Burrows, Lori L. 2012. « Pseudomonas Aeruginosa Twitching Motility: Type IV Pili in Action ». *Annual Review of Microbiology* 66 (1): 493-520. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150055>.
- Butterworth, Michael B., Liang Zhang, Elisa M. Heidrich, Michael M. Myerburg, et Patrick H. Thibodeau. 2012. « Activation of the Epithelial Sodium Channel (ENaC) by the Alkaline Protease from Pseudomonas Aeruginosa ». *Journal of Biological Chemistry* 287 (39): 32556-65. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.369520>.
- Canene-Adams, Kirstie. 2013. « General PCR ». In *Methods in Enzymology*, 529:291-98. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00024-0>.
- Cella, Marina, Anja Fuchs, William Vermi, Fabio Facchetti, Karel Otero, Jochen K. M. Lennerz, Jason M. Doherty, Jason C. Mills, et Marco Colonna. 2009. « A Human Natural Killer Cell Subset Provides an Innate Source of IL-22 for Mucosal Immunity ». *Nature* 457 (7230): 722-25. <https://doi.org/10.1038/nature07537>.
- Cella, Marina, Karel Otero, et Marco Colonna. 2010. « Expansion of Human NK-22 Cells with IL-7, IL-2, and IL-1 β Reveals Intrinsic Functional Plasticity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (24): 10961-66. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005641107>.
- Chen, Liang, Weifeng He, Sean T. Kim, Jian Tao, Yunfei Gao, Hongbo Chi, Andrew M. Intlekofer, et al. 2007. « Epigenetic and Transcriptional Programs Lead to Default IFN- γ Production by $\Gamma\delta$ T Cells ». *The Journal of Immunology* 178 (5): 2730-36. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.5.2730>.

Bibliographie

Cherrier, Dylan E., Nicolas Serafini, et James P. Di Santo. 2018. « Innate Lymphoid Cell Development: A T Cell Perspective ». *Immunity* 48 (6): 1091-1103. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.05.010>.

Cherrier, Marie. 2014a. « Les cellules lymphoïdes innées: De nouveaux acteurs de la réponse immune mucosale ». *médecine/sciences* 30 (3): 280-88. <https://doi.org/10.1051/medsci/20143003016>.

———. 2014b. « Les cellules lymphoïdes innées: De nouveaux acteurs de la réponse immune mucosale ». *médecine/sciences* 30 (3): 280-88. <https://doi.org/10.1051/medsci/20143003016>.

Chornoguz, Olesya, Robert S. Hagan, Azeb Haile, Matthew L. Arwood, Christopher J. Gamper, Arnob Banerjee, et Jonathan D. Powell. 2017. « mTORC1 Promotes T-Bet Phosphorylation To Regulate Th1 Differentiation ». *The Journal of Immunology* 198 (10): 3939-48. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601078>.

Chuang, Li-Yeh, Yu-Huei Cheng, et Cheng-Hong Yang. 2013. « Specific Primer Design for the Polymerase Chain Reaction ». *Biotechnology Letters* 35 (10): 1541-49. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1249-8>.

Colonna, Marco. 2018a. « Innate Lymphoid Cells: Diversity, Plasticity, and Unique Functions in Immunity ». *Immunity* 48 (6): 1104-17. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.05.013>.

———. 2018b. « Innate Lymphoid Cells: Diversity, Plasticity, and Unique Functions in Immunity ». *Immunity* 48 (6): 1104-17. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.05.013>.

Conibear, Tim C. R., Mark D. P. Willcox, Judith L. Flanagan, et Hua Zhu. 2012. « Characterization of Protease IV Expression in Pseudomonas Aeruginosa Clinical Isolates ». *Journal of Medical Microbiology* 61 (2): 180-90. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.034561-0>.

Constantinides, Michael G., Benjamin D. McDonald, Philip A. Verhoef, et Albert Bendelac. 2014. « A Committed Precursor to Innate Lymphoid Cells ». *Nature* 508 (7496): 397-401. <https://doi.org/10.1038/nature13047>.

Crinier, Adeline, Charlotte Viant, Mathilde Girard-Madoux, et Éric Vivier. 2017a. « Les cellules lymphoïdes innées ». *médecine/sciences* 33 (5): 534-42. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173305018>.

———. 2017b. « Les cellules lymphoïdes innées ». *médecine/sciences* 33 (5): 534-42. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173305018>.

Bibliographie

- Crone, Stephanie, Martha Vives-Flórez, Lasse Kvich, Aaron M. Saunders, Matthew Malone, Mette H. Nicolaisen, Esteban Martínez-García, et al. 2020. « The Environmental Occurrence of *Pseudomonas Aeruginosa* ». *APMIS* 128 (3): 220-31. <https://doi.org/10.1111/apm.13010>.
- Cunningham, Fiona, James E Allen, Jamie Allen, Jorge Alvarez-Jarreta, M Ridwan Amode, Irina M Armean, Olanrewaju Austine-Orimoloye, et al. 2022. « Ensembl 2022 ». *Nucleic Acids Research* 50 (D1): D988-95. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1049>.
- Dalmas, Elise, Frank M. Lehmann, Erez Dror, Stephan Wueest, Constanze Thienel, Marcela Borsigova, Marc Stawiski, et al. 2017. « Interleukin-33-Activated Islet-Resident Innate Lymphoid Cells Promote Insulin Secretion through Myeloid Cell Retinoic Acid Production ». *Immunity* 47 (5): 928-942.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.10.015>.
- De Luca, A, T Zelante, C D'Angelo, S Zagarella, F Fallarino, A Spreca, R G Iannitti, et al. 2010. « IL-22 Defines a Novel Immune Pathway of Antifungal Resistance ». *Mucosal Immunology* 3 (4): 361-73. <https://doi.org/10.1038/mi.2010.22>.
- De Salvo, Carlo, Kristine-Ann Buela, et Theresa T. Pizarro. 2020. « Cytokine-Mediated Regulation of Innate Lymphoid Cell Plasticity in Gut Mucosal Immunity ». *Frontiers in Immunology* 11:585319. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.585319>.
- De Sousa, Telma, Michel Hébraud, Maria L. N. Enes Dapkevicius, Luís Maltez, José Eduardo Pereira, Rosa Capita, Carlos Alonso-Calleja, Gilberto Igrejas, et Patricia Poeta. 2021. « Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in *Pseudomonas Aeruginosa* ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (23): 12892. <https://doi.org/10.3390/ijms222312892>.
- Dieffenbach, C W, T M Lowe, et G S Dveksler. 1993. « General Concepts for PCR Primer Design. » *Genome Research* 3 (3): S30-37. <https://doi.org/10.1101/gr.3.3.S30>.
- Diggle, Stephen P., et Marvin Whiteley. 2020. « Microbe Profile: *Pseudomonas Aeruginosa*: Opportunistic Pathogen and Lab Rat: This Article Is Part of the Microbe Profiles Collection. » *Microbiology* 166 (1): 30-33. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000860>.
- Eberl, Gérard, Shana Marmon, Mary-Jean Sunshine, Paul D. Rennert, Yongwon Choi, et Dan R. Littman. 2004. « An Essential Function for the Nuclear Receptor ROR γ (t) in the Generation of Fetal Lymphoid Tissue Inducer Cells ». *Nature Immunology* 5 (1): 64-73. <https://doi.org/10.1038/ni1022>.
- Freschi, Luca, Antony T Vincent, Julie Jeukens, Jean-Guillaume Emond-Rheault, Irena Kukavica-Ibrulj, Marie-Josée Dupont, Steve J Charette, Brian Boyle, et Roger C Levesque. 2019. « The *Pseudomonas Aeruginosa* Pan-Genome Provides New Insights on Its

Bibliographie

Population Structure, Horizontal Gene Transfer, and Pathogenicity ». Édité par Bill Martin. *Genome Biology and Evolution* 11 (1): 109-20. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy259>.

Fuchs, Anja, William Vermi, Jacob S. Lee, Silvia Lonardi, Susan Gilfillan, Rodney D. Newberry, Marina Cella, et Marco Colonna. 2013a. « Intraepithelial Type 1 Innate Lymphoid Cells Are a Unique Subset of IL-12- and IL-15-Responsive IFN- γ -Producing Cells ». *Immunity* 38 (4): 769-81. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.02.010>.

———. 2013b. « Intraepithelial Type 1 Innate Lymphoid Cells Are a Unique Subset of IL-12- and IL-15-Responsive IFN- γ -Producing Cells ». *Immunity* 38 (4): 769-81. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.02.010>.

Gao, Yulong, Fernando Souza-Fonseca-Guimaraes, Tobias Bald, Susanna S Ng, Arabella Young, Shin Foong Ngiow, Jai Rautela, et al. 2017. « Tumor Immuno-evasion by the Conversion of Effector NK Cells into Type 1 Innate Lymphoid Cells ». *Nature Immunology* 18 (9): 1004-15. <https://doi.org/10.1038/ni.3800>.

Garibyan, Lilit, et Nidhi Avashia. 2013a. « Polymerase Chain Reaction ». *Journal of Investigative Dermatology* 133 (3): 1-4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>.

———. 2013b. « Polymerase Chain Reaction ». *Journal of Investigative Dermatology* 133 (3): 1-4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>.

Garrido-Mesa, N., J.-H. Schroeder, E. Stolarczyk, A. L. Gallagher, J. W. Lo, C. Bailey, L. Campbell, et al. 2019. « T-Bet Controls Intestinal Mucosa Immune Responses via Repression of Type 2 Innate Lymphoid Cell Function ». *Mucosal Immunology* 12 (1): 51-63. <https://doi.org/10.1038/s41385-018-0092-6>.

Geiger, Theresa L, et Joseph C Sun. 2016. « Development and Maturation of Natural Killer Cells ». *Current Opinion in Immunology* 39 (avril):82-89. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.01.007>.

Gellatly, Shaan L., et Robert E.W. Hancock. 2013. « *Pseudomonas Aeruginosa*: New Insights into Pathogenesis and Host Defenses ». *Pathogens and Disease* 67 (3): 159-73. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12033>.

Gerbe, François, Emmanuelle Sidot, Danielle J. Smyth, Makoto Ohmoto, Ichiro Matsumoto, Valérie Dardalhon, Pierre Cesses, et al. 2016. « Intestinal Epithelial Tuft Cells Initiate Type 2 Mucosal Immunity to Helminth Parasites ». *Nature* 529 (7585): 226-30. <https://doi.org/10.1038/nature16527>.

Bibliographie

Ghaedi, Maryam, et Fumio Takei. 2021. « Innate Lymphoid Cell Development ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 147 (5): 1549-60. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.03.009>.

Ghafoor, Aamir, Iain D. Hay, et Bernd H. A. Rehm. 2011. « Role of Exopolysaccharides in *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm Formation and Architecture ». *Applied and Environmental Microbiology* 77 (15): 5238-46. <https://doi.org/10.1128/AEM.00637-11>.

Ghannam, Mousa G., et Matthew Varacallo. 2024a. « Biochemistry, Polymerase Chain Reaction ». In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535453/>.

———. 2024b. « Biochemistry, Polymerase Chain Reaction ». In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535453/>.

Granato, Elisa T, Christoph Ziegenhain, Rasmus L Marvig, et Rolf Kümmerli. 2018. « Low Spatial Structure and Selection against Secreted Virulence Factors Attenuates Pathogenicity in *Pseudomonas Aeruginosa* ». *The ISME Journal* 12 (12): 2907-18. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0231-9>.

Green, Michael R., et Joseph Sambrook. 2019a. « Polymerase Chain Reaction ». *Cold Spring Harbor Protocols* 2019 (6): pdb.top095109. <https://doi.org/10.1101/pdb.top095109>.

———. 2019b. « Polymerase Chain Reaction ». *Cold Spring Harbor Protocols* 2019 (6): pdb.top095109. <https://doi.org/10.1101/pdb.top095109>.

Gronke, Konrad, Michael Kofoed-Nielsen, et Andreas Diefenbach. 2016. « Innate Lymphoid Cells, Precursors and Plasticity ». *Immunology Letters* 179 (novembre):9-18. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2016.07.004>.

Guo, Jingwen, David Starr, et Huazhang Guo. 2021. « Classification and Review of Free PCR Primer Design Software ». Édité par Wren Jonathan. *Bioinformatics* 36 (22-23): 5263-68. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa910>.

Guttenplan, Sarah B., et Daniel B. Kearns. 2013. « Regulation of Flagellar Motility during Biofilm Formation ». *FEMS Microbiology Reviews* 37 (6): 849-71. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12018>.

Halim, Timotheus Y.F., Catherine A. Steer, Laura Mathä, Matthew J. Gold, Itziar Martinez-Gonzalez, Kelly M. McNagny, Andrew N.J. McKenzie, et Fumio Takei. 2014. « Group 2 Innate Lymphoid Cells Are Critical for the Initiation of Adaptive T Helper 2 Cell-Mediated Allergic Lung Inflammation ». *Immunity* 40 (3): 425-35. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.01.011>.

Bibliographie

- Hall, Susan, Catherine McDermott, Shailendra Anoopkumar-Dukie, Amelia McFarland, Amanda Forbes, Anthony Perkins, Andrew Davey, et al. 2016. « Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas Aeruginosa* ». *Toxins* 8 (8): 236. <https://doi.org/10.3390/toxins8080236>.
- Hanash, Alan M., Jarrod A. Dudakov, Guoqiang Hua, Margaret H. O'Connor, Lauren F. Young, Natalie V. Singer, Mallory L. West, et al. 2012. « Interleukin-22 Protects Intestinal Stem Cells from Immune-Mediated Tissue Damage and Regulates Sensitivity to Graft versus Host Disease ». *Immunity* 37 (2): 339-50. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.05.028>.
- Hancock, Robert E.W., et David P. Speert. 2000. « Antibiotic Resistance in *Pseudomonas Aeruginosa*: Mechanisms and Impact on Treatment ». *Drug Resistance Updates* 3 (4): 247-55. <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0152>.
- Harly, Christelle, Maggie Cam, Jonathan Kaye, et Avinash Bhandoola. 2018. « Development and Differentiation of Early Innate Lymphoid Progenitors ». *The Journal of Experimental Medicine* 215 (1): 249-62. <https://doi.org/10.1084/jem.20170832>.
- Harly, Christelle, Devin Kenney, Gang Ren, Binbin Lai, Tobias Raabe, Qi Yang, Margaret C. Cam, Hai-Hui Xue, Keji Zhao, et Avinash Bhandoola. 2019. « The Transcription Factor TCF-1 Enforces Commitment to the Innate Lymphoid Cell Lineage ». *Nature Immunology* 20 (9): 1150-60. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0445-7>.
- Heinrich, Bernd, et Firouzeh Korangy. 2022. « Plasticity of Innate Lymphoid Cells in Cancer ». *Frontiers in Immunology* 13 (mai):886520. <https://doi.org/10.3389/fimmu-13-886520>.
- Herberman, Ronald B., Myrthel E. Nunn, Howard T. Holden, et David H. Lavrin. 1975a. « Natural Cytotoxic Reactivity of Mouse Lymphoid Cells against Syngeneic and Allogeneic Tumors. II. Characterization of Effector Cells ». *International Journal of Cancer* 16 (2): 230-39. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910160205>.
- . 1975b. « Natural Cytotoxic Reactivity of Mouse Lymphoid Cells against Syngeneic and Allogeneic Tumors. II. Characterization of Effector Cells ». *International Journal of Cancer* 16 (2): 230-39. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910160205>.
- Horcajada, Juan P., Milagro Montero, Antonio Oliver, Luisa Sorlí, Sònia Luque, Silvia Gómez-Zorrilla, Natividad Benito, et Santiago Grau. 2019. « Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* Infections ». *Clinical Microbiology Reviews* 32 (4): e00031-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00031-19>.

Bibliographie

Huang, Chen, et Jiacheng Bi. 2021. « Expression Regulation and Function of T-Bet in NK Cells ». *Frontiers in Immunology* 12:761920. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.761920>.

Huang, Yuefeng, Liying Guo, Jin Qiu, Xi Chen, Jane Hu-Li, Ulrich Siebenlist, Peter R. Williamson, Joseph F. Urban, et William E. Paul. 2015. « IL-25-Responsive, Lineage-Negative KLRG1(Hi) Cells Are Multipotential “inflammatory” Type 2 Innate Lymphoid Cells ». *Nature Immunology* 16 (2): 161-69. <https://doi.org/10.1038/ni.3078>.

Huang, Yuefeng, et William E. Paul. 2016. « Inflammatory Group 2 Innate Lymphoid Cells ». *International Immunology* 28 (1): 23-28. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxv044>.

Hughes, Tiffany, Edward L. Briercheck, Aharon G. Freud, Rossana Trotta, Susan McClory, Steven D. Scoville, Karen Keller, et al. 2014. « The Transcription Factor AHR Prevents the Differentiation of a Stage 3 Innate Lymphoid Cell Subset to Natural Killer Cells ». *Cell Reports* 8 (1): 150-62. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.042>.

Hwang, Eun Sook, Jeong-Ho Hong, et Laurie H. Glimcher. 2005. « IL-2 Production in Developing Th1 Cells Is Regulated by Heterodimerization of RelA and T-Bet and Requires T-Bet Serine Residue 508 ». *The Journal of Experimental Medicine* 202 (9): 1289-1300. <https://doi.org/10.1084/jem.20051044>.

Iiyama, Kazuhiro, Eigo Takahashi, Jae Man Lee, Hiroaki Mon, Mai Morishita, Takahiro Kusakabe, et Chisa Yasunaga-Aoki. 2017. « Alkaline Protease Contributes to Pyocyanin Production in *Pseudomonas Aeruginosa* ». *FEMS Microbiology Letters* 364 (7). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx051>.

Islam, Khursheed Ul, et Jawed Iqbal. 2020. « An Update on Molecular Diagnostics for COVID-19 ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10 (novembre):560616. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.560616>.

Jacobsen, Theis, Benjamin Bardiaux, Olivera Francetic, Nadia Izadi-Pruneyre, et Michael Nilges. 2020. « Structure and Function of Minor Pilins of Type IV Pili ». *Medical Microbiology and Immunology* 209 (3): 301-8. <https://doi.org/10.1007/s00430-019-00642-5>.

Javanmardi, Fatemeh, Amir Emami, Neda Pirbonyeh, Abdolkhalegh Keshavarzi, et Mahrokh Rajaei. 2019. « A Systematic Review and Meta-Analysis on Exo-Toxins Prevalence in Hospital Acquired *Pseudomonas Aeruginosa* Isolates ». *Infection, Genetics and Evolution* 75 (novembre):104037. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104037>.

Juelke, Kerstin, et Chiara Romagnani. 2016. « Differentiation of Human Innate Lymphoid Cells (ILCs) ». *Current Opinion in Immunology* 38 (février):75-85. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.11.005>.

Bibliographie

Jurado-Martín, Irene, Maite Sainz-Mejías, et Siobhán McClean. 2021. « *Pseudomonas Aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (6): 3128. <https://doi.org/10.3390/ijms22063128>.

Kansler, Emily R., et Ming O. Li. 2019. « Innate Lymphocytes—Lineage, Localization and Timing of Differentiation ». *Cellular & Molecular Immunology* 16 (7): 627-33. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0211-7>.

Kerr, K.G., et A.M. Snelling. 2009. « *Pseudomonas Aeruginosa*: A Formidable and Ever-Present Adversary ». *Journal of Hospital Infection* 73 (4): 338-44. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.04.020>.

Khehra, Nimrat, Inderbir S. Padda, et Cathi J. Swift. 2024. « Polymerase Chain Reaction (PCR) ». In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/>.

Kiessling, R., Eva Klein, et H. Wigzell. 1975. « „Natural” □ Killer Cells in the Mouse. I. Cytotoxic Cells with Specificity for Mouse Moloney Leukemia Cells. Specificity and Distribution According to Genotype ». *European Journal of Immunology* 5 (2): 112-17. <https://doi.org/10.1002/eji.1830050208>.

Kim, Brian S., Kelvin Wang, Mark C. Siracusa, Steven A. Saenz, Jonathan R. Brestoff, Laurel A. Monticelli, Mario Noti, et al. 2014. « Basophils Promote Innate Lymphoid Cell Responses in Inflamed Skin ». *The Journal of Immunology* 193 (7): 3717-25. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401307>.

King, Jerry D., Dana Kocíncová, Erin L. Westman, et Joseph S. Lam. 2009a. « Review: Lipopolysaccharide Biosynthesis in *Pseudomonas Aeruginosa* ». *Innate Immunity* 15 (5): 261-312. <https://doi.org/10.1177/1753425909106436>.

———. 2009b. « Review: Lipopolysaccharide Biosynthesis in *Pseudomonas Aeruginosa* ». *Innate Immunity* 15 (5): 261-312. <https://doi.org/10.1177/1753425909106436>.

Klose, Christoph S N, et David Artis. 2016a. « Innate Lymphoid Cells as Regulators of Immunity, Inflammation and Tissue Homeostasis ». *Nature Immunology* 17 (7): 765-74. <https://doi.org/10.1038/ni.3489>.

———. 2016b. « Innate Lymphoid Cells as Regulators of Immunity, Inflammation and Tissue Homeostasis ». *Nature Immunology* 17 (7): 765-74. <https://doi.org/10.1038/ni.3489>.

Bibliographie

———. 2016c. « Innate Lymphoid Cells as Regulators of Immunity, Inflammation and Tissue Homeostasis ». *Nature Immunology* 17 (7): 765-74. <https://doi.org/10.1038/ni.3489>.

Klose, Christoph S. N., Elina A. Kiss, Vera Schwierzeck, Karolina Ebert, Thomas Hoyler, Yannick d'Hargues, Nathalie Göppert, et al. 2013a. « A T-Bet Gradient Controls the Fate and Function of CCR6–ROR γ t+ Innate Lymphoid Cells ». *Nature* 494 (7436): 261-65. <https://doi.org/10.1038/nature11813>.

———. 2013b. « A T-Bet Gradient Controls the Fate and Function of CCR6–ROR γ t+ Innate Lymphoid Cells ». *Nature* 494 (7436): 261-65. <https://doi.org/10.1038/nature11813>.

Klose, Christoph S.N., Melanie Flach, Luisa Möhle, Leif Rogell, Thomas Hoyler, Karolina Ebert, Carola Fabiunke, et al. 2014a. « Differentiation of Type 1 ILCs from a Common Progenitor to All Helper-like Innate Lymphoid Cell Lineages ». *Cell* 157 (2): 340-56. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.030>.

———. 2014b. « Differentiation of Type 1 ILCs from a Common Progenitor to All Helper-like Innate Lymphoid Cell Lineages ». *Cell* 157 (2): 340-56. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.030>.

Kotas, Maya E., et Richard M. Locksley. 2018. « Why Innate Lymphoid Cells? » *Immunity* 48 (6): 1081-90. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.06.002>.

Kubista, Mikael, José Manuel Andrade, Martin Bengtsson, Amin Forootan, Jiri Jonák, Kristina Lind, Radek Sindelka, et al. 2006. « The Real-Time Polymerase Chain Reaction ». *Molecular Aspects of Medicine* 27 (2-3): 95-125. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>.

Kung, Vanderlene L., Egon A. Ozer, et Alan R. Hauser. 2010. « The Accessory Genome of *Pseudomonas Aeruginosa* ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74 (4): 621-41. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00027-10>.

Lam, Joseph S., Véronique L. Taylor, Salim T. Islam, Youai Hao, et Dana Kocíncová. 2011. « Genetic and Functional Diversity of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide ». *Frontiers in Microbiology* 2. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00118>.

Lamoril, J., M. Bogard, N. Ameziane, J.-C. Deybach, et P. Bouizegarène. 2007. « Biologie moléculaire et microbiologie clinique en 2007 ». *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 22 (1): 5-18. <https://doi.org/10.1016/j.immbio.2006.11.003>.

Laplante, Mathieu, et David M. Sabatini. 2009. « mTOR Signaling at a Glance ». *Journal of Cell Science* 122 (20): 3589-94. <https://doi.org/10.1242/jcs.051011>.

Bibliographie

- Lazarevic, Vanja, et Laurie H Glimcher. 2011. « T-Bet in Disease ». *Nature Immunology* 12 (7): 597-606. <https://doi.org/10.1038/ni.2059>.
- Lazarevic, Vanja, Laurie H. Glimcher, et Graham M. Lord. 2013. « T-Bet: A Bridge between Innate and Adaptive Immunity ». *Nature Reviews. Immunology* 13 (11): 777-89. <https://doi.org/10.1038/nri3536>.
- Lee, Ji Yoon, et Seok-Ho Hong. 2020. « Hematopoietic Stem Cells and Their Roles in Tissue Regeneration ». *International Journal of Stem Cells* 13 (1): 1-12. <https://doi.org/10.15283/ijsc19127>.
- Li, Kelvin, et Anushka Brownley. 2010a. « Primer Design for RT-PCR ». In *RT-PCR Protocols*, édité par Nicola King, 630:271-99. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-629-0_18.
- . 2010b. « Primer Design for RT-PCR ». In *RT-PCR Protocols*, édité par Nicola King, 630:271-99. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-629-0_18.
- Li, Yan, Shihao Chen, Yafei Chi, Yiran Yang, Xiwen Chen, Huating Wang, Zhe Lv, et al. 2019. « Kinetics of the Accumulation of Group 2 Innate Lymphoid Cells in IL-33-Induced and IL-25-Induced Murine Models of Asthma: A Potential Role for the Chemokine CXCL16 ». *Cellular & Molecular Immunology* 16 (1): 75-86. <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0182-0>.
- Lighvani, A. A., D. M. Frucht, D. Jankovic, H. Yamane, J. Aliberti, B. D. Hissong, B. V. Nguyen, et al. 2001. « T-Bet Is Rapidly Induced by Interferon-Gamma in Lymphoid and Myeloid Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (26): 15137-42. <https://doi.org/10.1073/pnas.261570598>.
- Lim, Ai Ing, Yan Li, Silvia Lopez-Lastra, Ralph Stadhouders, Franziska Paul, Armanda Casrouge, Nicolas Serafini, et al. 2017. « Systemic Human ILC Precursors Provide a Substrate for Tissue ILC Differentiation ». *Cell* 168 (6): 1086-1100.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.021>.
- Liu, Ce Feng, Gabriel S. Brandt, Quyen Q. Hoang, Natalia Naumova, Vanja Lazarevic, Eun Sook Hwang, Job Dekker, Laurie H. Glimcher, Dagmar Ringe, et Gregory A. Petsko. 2016. « Crystal Structure of the DNA Binding Domain of the Transcription Factor T-Bet Suggests Simultaneous Recognition of Distant Genome Sites ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (43). <https://doi.org/10.1073/pnas.1613914113>.

Bibliographie

Lorenz, Todd C. 2012a. « Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies ». *Journal of Visualized Experiments*, n° 63 (mai), 3998. <https://doi.org/10.3791/3998>.

———. 2012b. « Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies ». *Journal of Visualized Experiments*, n° 63 (mai), 3998. <https://doi.org/10.3791/3998>.

———. 2012c. « Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol plus Troubleshooting and Optimization Strategies ». *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, n° 63 (mai), e3998. <https://doi.org/10.3791/3998>.

———. 2012d. « Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies ». *Journal of Visualized Experiments*, n° 63 (mai), 3998. <https://doi.org/10.3791/3998>.

Ma, Luyan, Matthew Conover, Haiping Lu, Matthew R. Parsek, Kenneth Bayles, et Daniel J. Wozniak. 2009. « Assembly and Development of the *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm Matrix ». Édité par Frederick M. Ausubel. *PLoS Pathogens* 5 (3): e1000354. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000354>.

Maldonado, Rita F., Isabel Sá-Correia, et Miguel A. Valvano. 2016. « Lipopolysaccharide Modification in Gram-Negative Bacteria during Chronic Infection ». Édité par Chris Whitfield. *FEMS Microbiology Reviews* 40 (4): 480-93. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw007>.

Malloy, Jaret L., Ruud A. W. Veldhuizen, Brett A. Thibodeaux, Richard J. O'Callaghan, et Jo Rae Wright. 2005. « *Pseudomonas Aeruginosa* Protease IV Degrades Surfactant Proteins and Inhibits Surfactant Host Defense and Biophysical Functions ». *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 288 (2): L409-18. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00322.2004>.

Managò, Antonella, Katrin Anne Becker, Alexander Carpinteiro, Barbara Wilker, Matthias Soddemann, Aaron P. Seitz, Michael J. Edwards, Heike Grassmé, Ildiko Szabò, et Erich Gulbins. 2015. « *Pseudomonas Aeruginosa* Pyocyanin Induces Neutrophil Death via Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Acid Sphingomyelinase ». *Antioxidants & Redox Signaling* 22 (13): 1097-1110. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5979>.

Mebius, Reina E, Paul Rennert, et Irving L Weissman. 1997. « Developing Lymph Nodes Collect CD4 + CD3 - LT β + Cells That Can Differentiate to APC, NK Cells, and Follicular Cells but Not T or B Cells ». *Immunity* 7 (4): 493-504. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80371-4](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80371-4).

Bibliographie

- Melo-Gonzalez, Felipe, et Matthew R. Hepworth. 2017. « Functional and Phenotypic Heterogeneity of Group 3 Innate Lymphoid Cells ». *Immunology* 150 (3): 265-75. <https://doi.org/10.1111/imm.12697>.
- Michalska, Marta, et Philipp Wolf. 2015. « Pseudomonas Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing ». *Frontiers in Microbiology* 6 (septembre). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00963>.
- Mikami, Yohei, Gianluca Scarno, Beatrice Zitti, Han-Yu Shih, Yuka Kanno, Angela Santoni, John J O'Shea, et Giuseppe Sciumè. 2018. « NCR⁺ ILC3 Maintain Larger STAT4 Reservoir via T-BET to Regulate Type 1 Features upon IL-23 Stimulation in Mice ». *European Journal of Immunology* 48 (7): 1174-80. <https://doi.org/10.1002/eji.201847480>.
- Mohammadi, Hamed, Nadia Sharafkandi, Maryam Hemmatzadeh, Gholamreza Azizi, Mohammad Karimi, Farhad Jadidi-Niaragh, Behzad Baradaran, et Zohreh Babaloo. 2018. « The Role of Innate Lymphoid Cells in Health and Disease ». *Journal of Cellular Physiology* 233 (6): 4512-29. <https://doi.org/10.1002/jcp.26250>.
- Mulcahy, Lawrence R., Vincent M. Isabella, et Kim Lewis. 2014. « Pseudomonas Aeruginosa Biofilms in Disease ». *Microbial Ecology* 68 (1): 1-12. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0297-x>.
- Müller, Christoph W., et Bernhard G. Herrmann. 1997. « Crystallographic Structure of the T Domain–DNA Complex of the Brachyury Transcription Factor ». *Nature* 389 (6653): 884-88. <https://doi.org/10.1038/39929>.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, et H. Erlich. 1986. « Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction ». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51 (0): 263-73. <https://doi.org/10.1101/SQB.1986.051.01.032>.
- Martin, Fergal J, M Ridwan Amode, Alisha Aneja, Olanrewaju Austine-Orimoloye, Andrey G Azov, If Barnes, Arne Becker, et al. 2023. « Ensembl 2023 ». *Nucleic Acids Research* 51 (D1): D933-41. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac958>.
- Nabekura, Tsukasa, et Akira Shibuya. 2021. « Type 1 Innate Lymphoid Cells: Soldiers at the Front Line of Immunity ». *Biomedical Journal* 44 (2): 115-22. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.10.001>.
- Nagasawa, Maho, Hergen Spits, et Xavier Romero Ros. 2018. « Innate Lymphoid Cells (ILCs): Cytokine Hubs Regulating Immunity and Tissue Homeostasis ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10 (12): a030304. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030304>.

Bibliographie

- Naiche, L.A., Zachary Harrelson, Robert G. Kelly, et Virginia E. Papaioannou. 2005. « T-Box Genes in Vertebrate Development ». *Annual Review of Genetics* 39 (1): 219-39. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.073003.105925>.
- Nossal, G. J. V., A. Cunningham, G. F. Mitchell, et J. F. A. P. Miller. 1968. « CELL TO CELL INTERACTION IN THE IMMUNE RESPONSE ». *The Journal of Experimental Medicine* 128 (4): 839-53. <https://doi.org/10.1084/jem.128.4.839>.
- Nybo, Kristie. 2013. « Primer Design ». *BioTechniques* 54 (5): 249-50. <https://doi.org/10.2144/000114025>.
- Oh, Sera, et Eun Sook Hwang. 2014. « The Role of Protein Modifications of T-Bet in Cytokine Production and Differentiation of T Helper Cells ». *Journal of Immunology Research* 2014:589672. <https://doi.org/10.1155/2014/589672>.
- Ohne, Yoichiro, Jonathan S Silver, LuAnn Thompson-Snipes, Magalie A Collet, Jean Philippe Blanck, Brandi L Cantarel, Alan M Copenhaver, Alison A Humbles, et Yong-Jun Liu. 2016. « IL-1 Is a Critical Regulator of Group 2 Innate Lymphoid Cell Function and Plasticity ». *Nature Immunology* 17 (6): 646-55. <https://doi.org/10.1038/ni.3447>.
- Onder, Lucas, Renzo Danuser, Elke Scandella, Sonja Firner, Qian Chai, Thomas Hehlhans, Jens V. Stein, et Burkhard Ludewig. 2013. « Endothelial Cell-Specific Lymphotoxin- β Receptor Signaling Is Critical for Lymph Node and High Endothelial Venule Formation ». *Journal of Experimental Medicine* 210 (3): 465-73. <https://doi.org/10.1084/jem.20121462>.
- Ozer, Egon A, Jonathan P Allen, et Alan R Hauser. 2014. « Characterization of the Core and Accessory Genomes of *Pseudomonas Aeruginosa* Using Bioinformatic Tools Spine and AGEnt ». *BMC Genomics* 15 (1): 737. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-737>.
- Pang, Zheng, Renee Raudonis, Bernard R. Glick, Tong-Jun Lin, et Zhenyu Cheng. 2019. « Antibiotic Resistance in *Pseudomonas Aeruginosa*: Mechanisms and Alternative Therapeutic Strategies ». *Biotechnology Advances* 37 (1): 177-92. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>.
- Papaioannou, Virginia E. 2014. « The T-Box Gene Family: Emerging Roles in Development, Stem Cells and Cancer ». *Development (Cambridge, England)* 141 (20): 3819-33. <https://doi.org/10.1242/dev.104471>.
- Park, Eugene, Swapneel Patel, Qiuling Wang, Prabhakar Andhey, Konstantin Zaitsev, Sophia Porter, Maxwell Hershey, et al. 2019. « *Toxoplasma Gondii* Infection Drives Conversion of NK Cells into ILC1-like Cells ». *eLife* 8 (août):e47605. <https://doi.org/10.7554/eLife.47605>.

Bibliographie

Pikovskaya, Olga, Julie Chaix, Nyanza J. Rothman, Amélie Collins, Yen-Hua Chen, Anna M. Scipioni, Eric Vivier, et Steven L. Reiner. 2016. « Cutting Edge: Eomesodermin Is Sufficient To Direct Type 1 Innate Lymphocyte Development into the Conventional NK Lineage ». *The Journal of Immunology* 196 (4): 1449-54. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502396>.

Powell, N, J B Canavan, T T MacDonald, et G M Lord. 2010. « Transcriptional Regulation of the Mucosal Immune System Mediated by T-Bet ». *Mucosal Immunology* 3 (6): 567-77. <https://doi.org/10.1038/mi.2010.53>.

Powell, Nick, Alan W. Walker, Emilie Stolarczyk, James B. Canavan, M. Refik Gökmen, Ellen Marks, Ian Jackson, et al. 2012. « The Transcription Factor T-Bet Regulates Intestinal Inflammation Mediated by Interleukin-7 Receptor+ Innate Lymphoid Cells ». *Immunity* 37 (4): 674-84. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.09.008>.

Pritchard, Gretchen Harms, Ross M. Kedl, et Christopher A. Hunter. 2019. « The Evolving Role of T-Bet in Resistance to Infection ». *Nature Reviews. Immunology* 19 (6): 398-410. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0145-4>.

Rankin, Lucille C, Mathilde J H Girard-Madoux, Cyril Seillet, Lisa A Mielke, Yann Kerdiles, Aurore Fenis, Elisabeth Wieduwild, et al. 2016. « Complementarity and Redundancy of IL-22-Producing Innate Lymphoid Cells ». *Nature Immunology* 17 (2): 179-86. <https://doi.org/10.1038/ni.3332>.

Rankin, Lucille C., Joanna R. Groom, Michaël Chopin, Marco J. Herold, Jennifer A. Walker, Lisa A. Mielke, Andrew N. J. McKenzie, Sebastian Carotta, Stephen L. Nutt, et Gabrielle T. Belz. 2013. « The Transcription Factor T-Bet Is Essential for the Development of NKp46+ Innate Lymphocytes via the Notch Pathway ». *Nature Immunology* 14 (4): 389-95. <https://doi.org/10.1038/ni.2545>.

Rasamiravaka, Tsiry, Quentin Labtani, Pierre Duez, et Mondher El Jaziri. 2015. « The Formation of Biofilms by *Pseudomonas Aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms ». *BioMed Research International* 2015:1-17. <https://doi.org/10.1155/2015/759348>.

Raykova, Ana, Paolo Carrega, Frank M. Lehmann, Robert Ivanek, Vanessa Landtwing, Isaak Quast, Jan D. Lünemann, et al. 2017. « Interleukins 12 and 15 Induce Cytotoxicity and Early NK-Cell Differentiation in Type 3 Innate Lymphoid Cells ». *Blood Advances* 1 (27): 2679-91. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017008839>.

Remold, Susanna K., Christopher K. Brown, Justin E. Farris, Thomas C. Hundley, Jessica A. Perpich, et Megan E. Purdy. 2011. « Differential Habitat Use and Niche Partitioning by

Bibliographie

Pseudomonas Species in Human Homes ». *Microbial Ecology* 62 (3): 505-17. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9844-5>.

Reynders, Ana, Nadia Yessaad, Thien-Phong Vu Manh, Marc Dalod, Aurore Fenis, Camille Aubry, Georgios Nikitas, et al. 2011. « Identity, Regulation and *in Vivo* Function of Gut NKp46⁺ RORγt⁺ and NKp46⁺ RORγt⁻ Lymphoid Cells: Gut NKp46⁺ Innate Lymphoid Cells ». *The EMBO Journal* 30 (14): 2934-47. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.201>.

Rollet, Cécile, Laurent Gal, et Jean Guzzo. 2008. « Biofilm-Detached Cells, a Transition from a Sessile to a Planktonic Phenotype: A Comparative Study of Adhesion and Physiological Characteristics in *Pseudomonas Aeruginosa*: Physiology of Biofilm-Detached Cells and Recolonization ». *FEMS Microbiology Letters* 290 (2): 135-42. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01415.x>.

Romagnani, Chiara, Kerstin Juelke, Michela Falco, Barbara Morandi, Antonella D'Agostino, Roberta Costa, Giovanni Ratto, et al. 2007. « CD56brightCD16⁻ Killer Ig-Like Receptor⁻ NK Cells Display Longer Telomeres and Acquire Features of CD56dim NK Cells upon Activation ». *The Journal of Immunology* 178 (8): 4947-55. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.8.4947>.

Rosmaraki, Eleftheria E., Iyadh Douagi, Claude Roth, Francesco Colucci, Ana Cumano, et James P. Di Santo. 2001. « Identification of Committed NK Cell Progenitors in Adult Murine Bone Marrow ». *European Journal of Immunology* 31 (6): 1900-1909. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200106\)31:6<1900::AID-IMMU1900>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200106)31:6<1900::AID-IMMU1900>3.0.CO;2-M).

Rubtsova, Kira, Anatoly V. Rubtsov, Linda F. Van Dyk, John W. Kappler, et Philippa Marrack. 2013. « T-Box Transcription Factor T-Bet, a Key Player in a Unique Type of B-Cell Activation Essential for Effective Viral Clearance ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (34). <https://doi.org/10.1073/pnas.1312348110>.

Rumsby, Gill. 2006. « An Introduction to PCR Techniques ». In *Hormone Assays in Biological Fluids*, édité par Michael J. Wheeler et J. S. Morley Hutchinson, 75-89. Totowa, NJ: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-986-9:75>.

Saiki, Randall K., David H. Gelfand, Susanne Stoffel, Stephen J. Scharf, Russell Higuchi, Glenn T. Horn, Kary B. Mullis, et Henry A. Erlich. 1988. « Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase ». *Science* 239 (4839): 487-91. <https://doi.org/10.1126/science.2448875>.

Samson, Sandrine I, Odile Richard, Manuela Tavian, Thomas Ranson, Christian A.J Vosshenrich, Francesco Colucci, Jan Buer, Frank Grosveld, Isabelle Godin, et James P Di

Bibliographie

Santo. 2003. « GATA-3 Promotes Maturation, IFN- γ Production, and Liver-Specific Homing of NK Cells ». *Immunity* 19 (5): 701-11. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00294-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00294-2).

Sandoval-Motta, Santiago, et Maximino Aldana. 2016. « Adaptive Resistance to Antibiotics in Bacteria: A Systems Biology Perspective ». *WIREs Systems Biology and Medicine* 8 (3): 253-67. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1335>.

Sanger, F., S. Nicklen, et A. R. Coulson. 1977. « DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74 (12): 5463-67. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>.

Sanos, Stephanie L., Viet L. Bui, Arthur Mortha, Karin Oberle, Charlotte Heners, Caroline Johner, et Andreas Diefenbach. 2009. « ROR γ and Commensal Microflora Are Required for the Differentiation of Mucosal Interleukin 22-Producing NKp46+ Cells ». *Nature Immunology* 10 (1): 83-91. <https://doi.org/10.1038/ni.1684>.

Satoh-Takayama, Naoko, Christian A. J. Vosshenrich, Sarah Lesjean-Pottier, Shinichiro Sawa, Matthias Lochner, Frederique Rattis, Jean-Jacques Mention, et al. 2008. « Microbial Flora Drives Interleukin 22 Production in Intestinal NKp46+ Cells That Provide Innate Mucosal Immune Defense ». *Immunity* 29 (6): 958-70. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.11.001>.

Scott, Alison J., Benjamin L. Oyler, David R. Goodlett, et Robert K. Ernst. 2017. « Lipid A Structural Modifications in Extreme Conditions and Identification of Unique Modifying Enzymes to Define the Toll-like Receptor 4 Structure-Activity Relationship ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1862 (11): 1439-50. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.01.004>.

Scoville, Steven D., Aharon G. Freud, et Michael A. Caligiuri. 2019. « Cellular Pathways in the Development of Human and Murine Innate Lymphoid Cells ». *Current Opinion in Immunology* 56 (février):100-106. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.11.003>.

Serafini, Nicolas, Roel G.J. Klein Wolterink, Naoko Satoh-Takayama, Wei Xu, Christian A.J. Vosshenrich, Rudi W. Hendriks, et James P. Di Santo. 2014. « *Gata3* Drives Development of ROR γ t+ Group 3 Innate Lymphoid Cells ». *Journal of Experimental Medicine* 211 (2): 199-208. <https://doi.org/10.1084/jem.20131038>.

Serre, Karine, Adam F. Cunningham, Ruth E. Coughlan, Andreia C. Lino, Antal Rot, Elin Hub, Katrin Moser, et al. 2012. « CD8 T Cells Induce T-Bet-Dependent Migration toward CXCR3 Ligands by Differentiated B Cells Produced during Responses to Alum-Protein Vaccines ». *Blood* 120 (23): 4552-59. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-417733>.

Bibliographie

- Shao, Fei, Dou Yu, Pengyan Xia, et Shuo Wang. 2021. « Dynamic Regulation of Innate Lymphoid Cells in the Mucosal Immune System ». *Cellular & Molecular Immunology* 18 (6): 1387-94. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00689-6>.
- Sheikh, Abdalla, et Ninan Abraham. 2019. « Interleukin-7 Receptor Alpha in Innate Lymphoid Cells: More Than a Marker ». *Frontiers in Immunology* 10:2897. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02897>.
- Simonetta, Federico, Amandine Pradier, et Eddy Roosnek. 2016. « T-Bet and Eomesodermin in NK Cell Development, Maturation, and Function ». *Frontiers in Immunology* 7:241. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00241>.
- Smith, Lucas, Barbara Rose, Pholawat Tingpej, Hua Zhu, Tim Conibear, Jim Manos, Peter Bye, et al. 2006. « Protease IV Production in *Pseudomonas Aeruginosa* from the Lungs of Adults with Cystic Fibrosis ». *Journal of Medical Microbiology* 55 (12): 1641-44. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46845-0>.
- Sonnenberg, Gregory F., Laurel A. Monticelli, Theresa Alenghat, Thomas C. Fung, Natalie A. Hutnick, Jun Kunisawa, Naoko Shibata, et al. 2012. « Innate Lymphoid Cells Promote Anatomical Containment of Lymphoid-Resident Commensal Bacteria ». *Science* 336 (6086): 1321-25. <https://doi.org/10.1126/science.1222551>.
- Sonnenberg, Gregory F., Laurel A. Monticelli, M. Merle Elloso, Lynette A. Fouser, et David Artis. 2011. « CD4⁺ Lymphoid Tissue-Inducer Cells Promote Innate Immunity in the Gut ». *Immunity* 34 (1): 122-34. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.12.009>.
- Spits, Hergen, David Artis, Marco Colonna, Andreas Diefenbach, James P. Di Santo, Gerard Eberl, Shigeo Koyasu, et al. 2013a. « Innate Lymphoid Cells — a Proposal for Uniform Nomenclature ». *Nature Reviews Immunology* 13 (2): 145-49. <https://doi.org/10.1038/nri3365>.
- . 2013b. « Innate Lymphoid Cells — a Proposal for Uniform Nomenclature ». *Nature Reviews Immunology* 13 (2): 145-49. <https://doi.org/10.1038/nri3365>.
- Spits, Hergen, et James P Di Santo. 2011. « The Expanding Family of Innate Lymphoid Cells: Regulators and Effectors of Immunity and Tissue Remodeling ». *Nature Immunology* 12 (1): 21-27. <https://doi.org/10.1038/ni.1962>.
- Steimle, Alex, Ingo B. Autenrieth, et Julia-Stefanie Frick. 2016. « Structure and Function: Lipid A Modifications in Commensals and Pathogens ». *International Journal of Medical Microbiology* 306 (5): 290-301. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.03.001>.

Bibliographie

Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warren, M. J. Hickey, F.S. L. Brinkman, et al. 2000a. « Complete Genome Sequence of *Pseudomonas Aeruginosa* PAO1, an Opportunistic Pathogen ». *Nature* 406 (6799): 959-64. <https://doi.org/10.1038/35023079>.

———. 2000b. « Complete Genome Sequence of *Pseudomonas Aeruginosa* PAO1, an Opportunistic Pathogen ». *Nature* 406 (6799): 959-64. <https://doi.org/10.1038/35023079>.

Stempel, Nikola, Anke Neidig, Michael Nusser, Robert Geffers, Julien Vieillard, Olivier Lesouhaitier, Gerald Brenner-Weiss, et Joerg Overhage. 2013. « Human Host Defense Peptide LL-37 Stimulates Virulence Factor Production and Adaptive Resistance in *Pseudomonas Aeruginosa* ». Édité par Suzanne Fleiszig. *PLoS ONE* 8 (12): e82240. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082240>.

Strober, Warren, et Ivan J. Fuss. 2011. « Proinflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases ». *Gastroenterology* 140 (6): 1756-1767.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.02.016>.

Szabo, Susanne J, Sean T Kim, Gina L Costa, Xiankui Zhang, C.Garrison Fathman, et Laurie H Glimcher. 2000. « A Novel Transcription Factor, T-Bet, Directs Th1 Lineage Commitment ». *Cell* 100 (6): 655-69. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80702-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80702-3).

Takaki-Kuwahara, Ayako, Yojiro Arinobu, Kohta Miyawaki, Hisakata Yamada, Hirofumi Tsuzuki, Kensuke Irino, Masahiro Ayano, et al. 2019. « CCR6+ Group 3 Innate Lymphoid Cells Accumulate in Inflamed Joints in Rheumatoid Arthritis and Produce Th17 Cytokines ». *Arthritis Research & Therapy* 21 (1): 198. <https://doi.org/10.1186/s13075-019-1984-x>.

Takashima, Yasuo, et Atsushi Suzuki. 2013. « Regulation of Organogenesis and Stem Cell Properties by T-Box Transcription Factors ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 70 (20): 3929-45. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1305-5>.

Talà, Lorenzo, Adam Fineberg, Philipp Kukura, et Alexandre Persat. 2019. « *Pseudomonas Aeruginosa* Orchestrates Twitching Motility by Sequential Control of Type IV Pili Movements ». *Nature Microbiology* 4 (5): 774-80. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0378-9>.

Taylor, Patrick K., Amy T.Y. Yeung, et Robert E.W. Hancock. 2014. « Antibiotic Resistance in *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms: Towards the Development of Novel Anti-Biofilm Therapies ». *Journal of Biotechnology* 191 (décembre):121-30. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.09.003>.

the Immunological Genome Consortium, Michelle L Robinette, Anja Fuchs, Victor S Cortez, Jacob S Lee, Yaming Wang, Scott K Durum, Susan Gilfillan, et Marco Colonna. 2015.

Bibliographie

« Transcriptional Programs Define Molecular Characteristics of Innate Lymphoid Cell Classes and Subsets ». *Nature Immunology* 16 (3): 306-17. <https://doi.org/10.1038/ni.3094>.

Thi, Minh Tam Tran, David Wibowo, et Bernd H.A. Rehm. 2020. « Pseudomonas Aeruginosa Biofilms ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (22): 8671. <https://doi.org/10.3390/ijms21228671>.

Thornton, Brenda, et Chhandak Basu. 2011. « Real-time PCR (qPCR) Primer Design Using Free Online Software ». *Biochemistry and Molecular Biology Education* 39 (2): 145-54. <https://doi.org/10.1002/bmb.20461>.

Tizian, Caroline, Annette Lahmann, Oliver Hölsken, Catalina Cosovanu, Michael Kofoed-Branzk, Frederik Heinrich, Mir-Farzin Mashreghi, Andrey Kruglov, Andreas Diefenbach, et Christian Neumann. 2020. « C-Maf Restrains T-Bet-Driven Programming of CCR6-Negative Group 3 Innate Lymphoid Cells ». *eLife* 9 (février):e52549. <https://doi.org/10.7554/eLife.52549>.

Tolomeo, Manlio, Andrea Cavalli, et Antonio Cascio. 2022. « STAT1 and Its Crucial Role in the Control of Viral Infections ». *International Journal of Molecular Sciences* 23 (8): 4095. <https://doi.org/10.3390/ijms23084095>.

Townsend, Michael J, Amy S Weinmann, Jennifer L Matsuda, Rachelle Salomon, Peggy J Farnham, Christine A Biron, Laurent Gapin, et Laurie H Glimcher. 2004. « T-Bet Regulates the Terminal Maturation and Homeostasis of NK and V α 14i NKT Cells ». *Immunity* 20 (4): 477-94. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(04\)00076-7](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(04)00076-7).

Tsymala, Irina, et Karl Kuchler. 2023. « Innate Lymphoid Cells-Underexplored Guardians of Immunity ». *PLoS Pathogens* 19 (10): e1011678. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011678>.

Uddin, Tanvir Mahtab, Arka Jyoti Chakraborty, Ameer Khusro, Bm Redwan Matin Zidan, Saikat Mitra, Talha Bin Emran, Kuldeep Dhama, et al. 2021. « Antibiotic Resistance in Microbes: History, Mechanisms, Therapeutic Strategies and Future Prospects ». *Journal of Infection and Public Health* 14 (12): 1750-66. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>.

Valot, Benoît, Christophe Guyeux, Julien Yves Rolland, Kamel Mazouzi, Xavier Bertrand, et Didier Hocquet. 2015. « What It Takes to Be a Pseudomonas Aeruginosa? The Core Genome of the Opportunistic Pathogen Updated ». Édité par Gunnar F Kaufmann. *PLOS ONE* 10 (5): e0126468. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126468>.

Viant, Charlotte, Lucille C. Rankin, Mathilde J. H. Girard-Madoux, Cyril Seillet, Wei Shi, Mark J. Smyth, Laurent Bartholin, et al. 2016. « Transforming Growth Factor- β and Notch Ligands

Bibliographie

Act as Opposing Environmental Cues in Regulating the Plasticity of Type 3 Innate Lymphoid Cells ». *Science Signaling* 9 (426). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaf2176>.

Villanova, Federica, Barry Flutter, Isabella Tosi, Katarzyna Grys, Hemawtee Sreeneebus, Gayathri K. Perera, Anna Chapman, Catherine H. Smith, Paola Di Meglio, et Frank O. Nestle. 2014a. « Characterization of Innate Lymphoid Cells in Human Skin and Blood Demonstrates Increase of NKp44+ ILC3 in Psoriasis ». *Journal of Investigative Dermatology* 134 (4): 984-91. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.477>.

———. 2014b. « Characterization of Innate Lymphoid Cells in Human Skin and Blood Demonstrates Increase of NKp44+ ILC3 in Psoriasis ». *Journal of Investigative Dermatology* 134 (4): 984-91. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.477>.

Vivier, Eric, David Artis, Marco Colonna, Andreas Diefenbach, James P. Di Santo, Gérard Eberl, Shigeo Koyasu, et al. 2018. « Innate Lymphoid Cells: 10 Years On ». *Cell* 174 (5): 1054-66. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.017>.

Vivier, Eric, Elena Tomasello, Myriam Baratin, Thierry Walzer, et Sophie Ugolini. 2008. « Functions of Natural Killer Cells ». *Nature Immunology* 9 (5): 503-10. <https://doi.org/10.1038/ni1582>.

Von Moltke, Jakob, Ming Ji, Hong-Erh Liang, et Richard M. Locksley. 2016. « Tuft-Cell-Derived IL-25 Regulates an Intestinal ILC2–Epithelial Response Circuit ». *Nature* 529 (7585): 221-25. <https://doi.org/10.1038/nature16161>.

Wages, J.M. 2005. « POLYMERASE CHAIN REACTION ». In *Encyclopedia of Analytical Science*, 243-50. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00475-1>.

Walker, Jennifer A., et Andrew N. J. McKenzie. 2013. « Development and Function of Group 2 Innate Lymphoid Cells ». *Current Opinion in Immunology* 25 (2): 148-55. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.02.010>.

Wang, Shuo, Yuan Qu, Pengyan Xia, Yi Chen, Xiaoxiao Zhu, Jing Zhang, Guan Wang, Yong Tian, Jianming Ying, et Zusen Fan. 2020. « Transdifferentiation of Tumor Infiltrating Innate Lymphoid Cells during Progression of Colorectal Cancer ». *Cell Research* 30 (7): 610-22. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0312-y>.

Wang, Shuo, Pengyan Xia, Yi Chen, Yuan Qu, Zhen Xiong, Buqing Ye, Ying Du, et al. 2017. « Regulatory Innate Lymphoid Cells Control Innate Intestinal Inflammation ». *Cell* 171 (1): 201-216.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.027>.

Bibliographie

- Wattler, Sigrid, Andreas Russ, Martin Evans, et Michael Nehls. 1998. « A Combined Analysis of Genomic and Primary Protein Structure Defines the Phylogenetic Relationship of New Members of the T-Box Family ». *Genomics* 48 (1): 24-33. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.5150>.
- Wittmeier, Patrick, et Susanne Hummel. 2022. « Agarose Gel Electrophoresis to Assess PCR Product Yield: Comparison with Spectrophotometry, Fluorometry and qPCR ». *BioTechniques* 72 (4): 155-58. <https://doi.org/10.2144/btn-2021-0094>.
- Wolf, Philipp, et Ursula Elsässer-Beile. 2009. « Pseudomonas Exotoxin A: From Virulence Factor to Anti-Cancer Agent ». *International Journal of Medical Microbiology* 299 (3): 161-76. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2008.08.003>.
- Wolffs, Petra, Halfdan Grage, Oskar Hagberg, et Peter Rådström. 2004. « Impact of DNA Polymerases and Their Buffer Systems on Quantitative Real-Time PCR ». *Journal of Clinical Microbiology* 42 (1): 408-11. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.1.408-411.2004>.
- Wong, See Heng, Jennifer A Walker, Helen E Jolin, Lesley F Drynan, Emily Hams, Ana Camelo, Jillian L Barlow, et al. 2012. « Transcription Factor ROR α Is Critical for Nuocyte Development ». *Nature Immunology* 13 (3): 229-36. <https://doi.org/10.1038/ni.2208>.
- Xu, Weifeng, et J. Jillian Zhang. 2005. « Stat1-Dependent Synergistic Activation of T-Bet for IgG2a Production during Early Stage of B Cell Activation ». *The Journal of Immunology* 175 (11): 7419-24. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.11.7419>.
- Yagi, Ryoji, Chao Zhong, Daniel L. Northrup, Fang Yu, Nicolas Bouladoux, Sean Spencer, Gangqing Hu, et al. 2014. « The Transcription Factor GATA3 Is Critical for the Development of All IL-7R α -Expressing Innate Lymphoid Cells ». *Immunity* 40 (3): 378-88. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.01.012>.
- Yang, Jungmin, Kang-Mu Lee, Sangjun Park, Yoeseop Cho, Eunju Lee, Jong-Hwan Park, Ok Sarah Shin, Junghyun Son, Sang Sun Yoon, et Je-Wook Yu. 2017. « Bacterial Secretant from *Pseudomonas aeruginosa* Dampens Inflammasome Activation in a Quorum Sensing-Dependent Manner ». *Frontiers in Immunology* 8 (mars). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00333>.
- Yang, Liang, Yifan Hu, Yang Liu, Jingdong Zhang, Jens Ulstrup, et Søren Molin. 2011. « Distinct Roles of Extracellular Polymeric Substances in *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm Development ». *Environmental Microbiology* 13 (7): 1705-17. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02503.x>.

Bibliographie

- Yang, Yu, Jordi C. Ochando, Jonathan S. Bromberg, et Yaozhong Ding. 2007. « Identification of a Distant T-Bet Enhancer Responsive to IL-12/Stat4 and IFN γ /Stat1 Signals ». *Blood* 110 (7): 2494-2500. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-11-058271>.
- Yang, Zhiqing, Tengqian Tang, Xiaolin Wei, Shuang Yang, et Zhiqiang Tian. 2015. « Type 1 Innate Lymphoid Cells Contribute to the Pathogenesis of Chronic Hepatitis B ». *Innate Immunity* 21 (6): 665-73. <https://doi.org/10.1177/1753425915586074>.
- Yazdani, Reza, Mehri Sharifi, Aylar Saba Shirvan, Gholamreza Azizi, et Mazdak Ganjalikhani-Hakemi. 2015. « Characteristics of Innate Lymphoid Cells (ILCs) and Their Role in Immunological Disorders (an Update) ». *Cellular Immunology* 298 (1-2): 66-76. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.09.006>.
- Ye, Jian, George Coulouris, Irena Zaretskaya, Ioana Cutcutache, Steve Rozen, et Thomas L. Madden. 2012. « Primer-BLAST: A Tool to Design Target-Specific Primers for Polymerase Chain Reaction ». *BMC Bioinformatics* 13 (juin):134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>.
- Yokota, Y., A. Mansouri, S. Mori, S. Sugawara, S. Adachi, S. Nishikawa, et P. Gruss. 1999. « Development of Peripheral Lymphoid Organs and Natural Killer Cells Depends on the Helix-Loop-Helix Inhibitor Id2 ». *Nature* 397 (6721): 702-6. <https://doi.org/10.1038/17812>.
- Yu, Yong, Jason C. H. Tsang, Cui Wang, Simon Clare, Juexuan Wang, Xi Chen, Cordelia Brandt, et al. 2016. « Single-Cell RNA-Seq Identifies a PD-1hi ILC Progenitor and Defines Its Development Pathway ». *Nature* 539 (7627): 102-6. <https://doi.org/10.1038/nature20105>.
- Zhang, Kangning, Xingyuan Xu, Muhammad Asghar Pasha, Christian W. Siebel, Angelica Costello, Angela Haczku, Katherine MacNamara, et al. 2017. « Cutting Edge: Notch Signaling Promotes the Plasticity of Group-2 Innate Lymphoid Cells ». *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 198 (5): 1798-1803. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601421>.
- Zhang, Xingying, Xin Wen, Ning Feng, Aoxing Chen, Senbang Yao, Xin Ding, et Longzhen Zhang. 2020a. « Increased Expression of T-Box Transcription Factor Protein 21 (TBX21) in Skin Cutaneous Melanoma Predicts Better Prognosis: A Study Based on The Cancer Genome Atlas (TCGA) and Genotype-Tissue Expression (GTEx) Databases ». *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 26 (juin):e923087. <https://doi.org/10.12659/MSM.923087>.
- . 2020b. « Increased Expression of T-Box Transcription Factor Protein 21 (TBX21) in Skin Cutaneous Melanoma Predicts Better Prognosis: A Study Based on The Cancer

Bibliographie

Genome Atlas (TCGA) and Genotype-Tissue Expression (GTEx) Databases ». *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 26 (juin):e923087. <https://doi.org/10.12659/MSM.923087>.

Zhong, Chao, Kairong Cui, Christoph Wilhelm, Gangqing Hu, Kairui Mao, Yasmine Belkaid, Keji Zhao, et Jinfang Zhu. 2016. « Group 3 Innate Lymphoid Cells Continuously Require the Transcription Factor GATA-3 after Commitment ». *Nature Immunology* 17 (2): 169-78. <https://doi.org/10.1038/ni.3318>.

Zhong, Chao, Mingzhu Zheng, et Jinfang Zhu. 2018. « Lymphoid Tissue Inducer-A Divergent Member of the ILC Family ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 42 (août):5-12. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2018.02.004>.

Zhu, Hanliang, Haoqing Zhang, Ying Xu, Soňa Laššáková, Marie Korabečná, et Pavel Neužil. 2020a. « PCR Past, Present and Future ». *BioTechniques* 69 (4): 317-25. <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0057>.

———. 2020b. « PCR Past, Present and Future ». *BioTechniques* 69 (4): 317-25. <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0057>.

Zook, Erin C, et Barbara L Kee. 2016. « Development of Innate Lymphoid Cells ». *Nature Immunology* 17 (7): 775-82. <https://doi.org/10.1038/ni.3481>.

Résumé

Introduction : *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) est une bactérie pathogène à Gram négatif, non sporulée, aérobie et capable de provoquer plusieurs infections chez les personnes immunodéprimées. Les réponses immunitaires innées de l'hôte contre cette bactérie nécessitent l'intervention de nombreuses cellules immunitaires y compris les cellules lymphoïdes innées (ILCs), qui sont une population cellulaire qui répond rapidement aux signaux provenant des tissus infectés ou endommagés et génère un ensemble de cytokines qui régulent le développement des réponses antibactériennes. La diversité des populations des ILCs est sous le contrôle de multiples facteurs de transcription tels que T-bet, qui contrôle le développement et la maturation fonctionnelle des ILCs1 et des NKp46+ILCs3.

Objectifs : Concevoir des séquences d'oligonucléotides encadrant une partie du gène *TBX21* exprimé par les ILCs1 et les NKp46+ILCs3 au cours de l'infection par *P. aeruginosa*.

Matériel et méthodes : Dans ce travail, la base de données « Ensemble » a été utilisée afin d'obtenir la séquence génomique spécifique du gène *TBX21*. Ensuite, l'outil Primer-Blast du site « www.ncbi.nih.gov » a été utilisé pour élaborer les amorces spécifiques nécessaires à l'amplification de ce gène par PCR. Et enfin, la vérification de la fiabilité des paires d'amorces sélectionnées a été faite par l'outil PCR *in silico*.

Résultats : L'utilisation de l'outil Primer-BLAST nous a permis d'obtenir trois paires d'amorces répondant à tous les critères de choix de bonnes amorces.

Conclusion : En conclusion, les amorces choisies peuvent être utilisées pour l'étude de l'expression du gène *TBX21* dans diverses études ultérieures.

Mots clés : Amorce, *TBX21*, ILCs1, NKp46+ILCs3, Primer-BLAST, *Pseudomonas aeruginosa*.

Abstract

Introduction: *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) is a Gram-negative, non-spore-forming, aerobic, pathogenic bacterium capable of causing multiple infections in immunocompromised individuals. The host's innate immune responses against this bacterium require the intervention of numerous immune cells, including innate lymphoid cells (ILCs), which are a cell population that responds rapidly to signals from infected or damaged tissue and generates a set of cytokines that regulate the development of antibacterial responses. The diversity of ILC populations is under the control of multiple transcription factors such as T-bet, which controls the development and functional maturation of ILCs1 and NKp46+ILCs3.

Objectives: Design oligonucleotide sequences framing a part of the *TBX21* gene expressed by ILCs1 and NKp46+ILCs3 during bacterial infection by *Pseudomonas aeruginosa*.

Material and methods: In this work, the "Ensemble" database was used to obtain the specific genomic sequence of the *TBX21* gene. Next, the Primer-Blast tool from the "www.ncbi.nih.gov" website was used to develop the specific primers required for PCR amplification of this gene. Finally, the reliability of the selected primer pairs was verified using the *in silico* PCR tool.

Results: Using the Primer-BLAST tool, we obtained three pairs of primers meeting all the criteria for choosing good primers.

Conclusion: In conclusion, the chosen primers can be used for the study of the expression of the *TBX21* gene in various subsequent studies.

Key words: Primer, *TBX21* Gene, ILC1, NKp46+ILCs3, Primer-BLAST, PCR, *Pseudomonas aeruginosa*.

المخلص

المقدمة: *Pseudomonas aeruginosa* هي بكتيريا ممرضة، سلبية الجرام، غير قابلة للأبواغ، هوائية وقادرة على التسبب في العديد من حالات العدوى عند الأشخاص الذين يعانون من ضعف المناعة. الاستجابات المناعية الفطرية للإنسان ضد هذه البكتيريا تتطلب تدخل العديد من الخلايا مثل الخلايا المفاوية الفطرية (ILCs) التي تستجيب بسرعة للإشارات القادمة من الأنسجة المصابة بعدوى أو التالفة فتنتج مجموعة من السيتوكينات التي تنظم تطور استجابة مناعية ضد البكتيريا. يكون تنوع مجموعات الخلايا المفاوية الفطرية تحت تحكم العديد من عوامل الاستنساخ مثل T-bet الذي يتحكم في التطور والنضج الوظيفي للخلايا ILCs1 و NKp46+ILCs3.

الهدف: تصميم تسلسل قليل النيكليوتيد يحيط بجزء من المورثة *TBX21* معبر عنه بواسطة الخلايا ILCs1 و NKp46+ILCs3 خلال عدوى بكتيرية سببها *Pseudomonas aeruginosa*.

المواد والطرق: في هذا العمل، تم استعمال قاعدة البيانات «Ensemble» للوصول إلى التسلسل الجيني للمورثة *TBX21* والأداة Primer-Blast في الموقع «www.ncbi.nih.gov» لتصميم البادئات الخاصة الضرورية لمضاعفة هذه المورثة ب PCR. التأكد من فعالية البادئات المختارة يتم من خلال الأداة *In silico* PCR.

النتيجة: استعمال الأداة PRIMER-BLAST سمح لنا بالحصول على ثلاثة أزواج من البادئات التي تستجيب لكل خصائص الاختيار الجيد للبادئات.

الخاتمة: يمكن استخدام البادئات التي تم الحصول عليها لدراسة الجين *TBX21* في دراسات الحقنة مختلفة.

لكلمات المفتاحية: بادئة، المورثة *TBX21*، ILCs1، NKp46+ILCs3، PRIMER-BLAST، PCR، *Pseudomonas aeruginosa*.

