



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

Boucherif Zeyneb Chahinaz

Attia Meryem El Batoul

En vue de l'option du

Diplôme de MASTER

En Immunologie

Thème :

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

Soutenu le 12 Juin 2024, devant le jury composé de :

Présidente	EIMEZOUAR 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 à Gram négatif, pathogène qui provoque des infections aiguës et chroniques compliquées. Les cellules lymphoïdes innées (ILC, *Innate lymphoid cells*) sont des composants du système immunitaire inné, homologues aux lymphocytes T CD4 + et récemment identifiés. Les deux sous populations des ILCs « ILC1s et ILC3s » se caractérisent par la production de l'IFN- γ , une cytokine qui joue un rôle important dans l'élimination des infections bactériennes.

Objectif : Conception d'amorces du gène *IFNG* exprimé par les ILC1 et ILC3 afin de caractériser les populations des ILCs impliquées dans les infections à *P. aeruginosa*.

Matériel et méthodes : Afin de concevoir des amorces spécifiques du gène *IFNG*, on a utilisé plusieurs outils : la base de données « www.ensembl.org », pour trouver de séquence spécifique du gène *IFNG* et un outil de primer-BLAST fourni par le NCBI pour concevoir des amorces. Les résultats sont confirmés par *in silico* PCR et primer-BLAST.

Résultats : L'utilisation de l'outil Primer-BLAST du site « www.ncbi.nih.gov » nous a permis d'obtenir des amorces spécifiques pour le gène *IFNG*, qui répondaient à tous les critères des bonnes amorces, et avec des produits aspécifiques supérieures à 1000Pb.

Conclusion : Le choix d'une bonne paire d'amorces pour amplifier le gène *IFNG* par PCR constitue une étape primordiale dans la réussite de cette technique et dans l'étude du rôle de ce gène dans l'immunité anti infectieuse.

Mots clés : *P. aeruginosa*, ILCs, *IFNG*, amorces, primer-Blast.

Abstract**Introduction:**

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) is a Gram-negative bacterium and a pathogen that may cause complicated acute and chronic infections. Innate lymphoid cells (ILCs) are components of the innate immune system, homologous to CD4 + T helper cells (Th), and recently identified. The subpopulations of ILCs “1 and 3” can eliminate *P. aeruginosa* by the production of IFN- γ which plays several roles against bacterial infections, and encoded by the *IFNG* gene.

Objective :

Design of primers for the *IFNG* gene expressed by ILC1 and ILC3 in order to study its role during *P. aeruginosa* infections.

Materials and methods :

In order to design primers specific to the *IFNG* gene, several tools were used: the “www.ensembl.org” database to find specific sequence of the *IFNG* gene and a primer-BLAST tool provided by the NCBI to design primers. The results are confirmed by in silico PCR and primer-BLAST.

Results :

The use of the Primer-BLAST tool from the “www.ncbi.nlm.nih.gov” site allowed us to obtain specific primers for the *IFNG* gene, which met all the criteria for good primers, and with nonspecific products superior to 1000Pb.

Conclusions :

The choice of a good pair of primers to amplify the *IFNG* gene by PCR (Polymerase Chain Reaction) constitutes an essential step in the success of this technique and in the study of the role of this gene in anti-infectious immunity.

Keywords : *P. aeruginosa*, ILC1, ILC3, *IFNG*, primers

ملخص

مقدمة:

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) هي بكتيريا سالبة الجرام، وهي عامل ممرض يسبب التهابات حادة ومزمنة معقدة. الخلايا للمفاوية الفطرية (ILC) هي مكونات تم تحديدها مؤخرًا في الجهاز المناعي الفطري، وهي متماثلة مع خلايا CD4 + T المساعدة (Th). يمكن للمجموعات السكانية الفرعية لـ ILC "1 و 2" القضاء على *P. aeruginosa* بفضل إنتاج γ -IFN الذي يلعب عدة أدوار ضد العدوى البكتيرية، ويتم تشفيره بواسطة جين *IFNG*.

الهدف:

تصميم البادئات لجين *IFNG* المعبر عنه بـ ILC1 و ILC3 من أجل دراسة دوره خلال عدوى *P. aeruginosa*.

المواد والطرق:

من أجل تصميم بادئات خاصة بجين *IFNG*، تم استخدام العديد من الأدوات: قاعدة بيانات "www.ensemble.org" للعثور على تسلسلات محددة لجين *IFNG* وأداة primer-BLAST المقدمة من NCBI لتصميم البادئات. تم تأكيد النتائج بواسطة

In silico PCR و primer-BLAST.

النتائج:

أتاح استخدام أداة primer-BLAST من موقع "www.ncbi.nih.gov" الحصول على بادئات محددة لجين *IFNG*، والتي استوفت جميع معايير البادئات الجيدة، وبمنتجات غير محددة تفوق 1000.

الاستنتاجات:

يشكل اختيار زوج جيد من البادئات لتضخيم جين *IFNG* بواسطة PCR (تفاعل البوليميراز المتسلسل) خطوة أساسية في نجاح هذه التقنية وفي دراسة دور هذا الجين في المناعة المضادة للعدوى.

الكلمات المفتاحية: *IFNG*، ILC3، ILC1، *P. aeruginosa*

Avant-propos

En premier lieu, nous remercions Dieu Tout-Puissant de nous avoir guidées et de nous avoir accordées la force et le courage de terminer notre travail.

Nous sommes heureux de remercier Pr Mourad ARIBI, Directeur du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie (BIOMOLIM) à l'Université de Tlemcen. Qui nous a accueillis dans son laboratoire et nous lui adressons nos sincères remerciements.

Nous adressons nos sincères remerciements à Madame Wafa NOUARI, Maître de conférences classe B, université de Tlemcen qui nous a aidés à réaliser ce travail grâce à ses informations précieuses, sa compréhension et ses conseils.

Nous tenons à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail et de nous consacrer une partie de leur temps, malgré leurs obligations professionnelles.

Nous tenons également à exprimer notre sincère gratitude à tous nos professeurs pour leur soutien et leurs conseils tout au long de nos études universitaires.

Nous tenons également à remercier toute l'équipe du laboratoire BIOMOLIM et la promotion MASTER 2 Immunologie 2023/2024.

Entièrement et tous ceux qui nous ont soutenus directement ou indirectement, même avec un mot gentil, ou ont prié Dieu pour que nous achevions ce travail avec sérieux et perfection.

Je dédie ce travail à : Mes chers parents, ma sœur, et mes frères, qui sont toujours à mes côtés, et sans qui, je ne serais rien.

Ma très chère mère, qui m'a soutenu et abreuvé tout au long de ma vie tendresse. Mon père, qui m'a aidé et m'a apporté encouragement. Ma chère sœur, Imane et mes frères Walid, Mohammed.

Je tiens également à remercier mes chers amis pour leur soutien inconditionnel et leurs encouragements. Ma chère amie et partenaire Meryem.

Toute personne qui m'a aidé. Merci infiniment

Zeyneb

Je voudrais exprimer tous mes remerciements, ma gratitude et mon appréciation à mon père bien-aimé et généreux, à ma mère chère et dévouée, à mon compagnon de chemin, à mon cher mari, et aussi à mes deux grand-mères bien-aimées avec leurs bénédictions.

Et toute ma gratitude et mon amour à tous mes frères et mes sœurs, et mes remerciements à toute la famille de mon mari, ainsi qu'à mon amie dans la recherche, Zeyneb, la meilleure partenaire. Merci pour votre soutien et pour ce que vous avez fait pour moi, que Dieu vous protège.

Meryem El-Batoul

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	lii
Abstract	lv
Résumé en Arabe	v
Avant-propos	vi
Table des matières	vii
Liste des figures	xi
Liste des tableaux	xiii
Liste des abréviations	xiv
Introduction	1
Chapitre 1. Revue de la littérature	3
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
1.1.1. Caractéristiques de <i>P. aeruginosa</i>	3
1.1.2. Habitat de <i>P. aeruginosa</i>	3
1.1.3. Facteur de pathogénicité de <i>P. aeruginosa</i>	3
1.1.3.1. Facteurs de virulence de surface	4
1.1.3.1.1. Les pili ou fimbriae	4
1.1.3.1.2. Flagelle	4
1.1.3.1.3. Lipopolysaccharide	4
1.1.3.1.4. Biofilm	6
1.1.3.2. Facteurs de virulence sécrétés	7
1.1.3.2.1. Exotoxine A	7
1.1.3.2.2. Exoenzymes S, T, U et Y	7
1.1.3.2.3. Protéase	8

1.1.3.2.4. Phospholipase	9
1.1.3.2.5. Pyocyanine	9
1.1.3.2.6. Métallophores	9
1.1.4. Épidémiologie	10
1.1.5. Résistance aux antibiotiques	10
1.1.5.1. Résistance intrinsèque	10
1.1.5.2. Résistance acquise	10
1.1.5.3. Résistance adaptative	11
1.2. Les cellules lymphoïdes innées	11
1.2.1. Découverte et nomenclature	11
1.2.2. Ontogénie	11
1.2.3. Sous populations	13
1.2.3.1. ILC1 du groupe 1	14
1.2.3.1.1. Les cellules NK	14
1.2.3.1.2. ILC1s	14
1.2.3.2. ILCs du groupe 2	15
1.2.3.3. ILCs du groupe 3	15
1.2.3.4. ILCreg	16
1.2.4. Plasticité	17
1.2.5. Rôle des ILCs	18
1.2.5.1. ILCs du groupe 1	18
1.2.5.2. ILC du groupe 2	19
1.2.5.3. ILCs du groupe 3	20
12.5.4. ILCreg	20

1.3. Interféron-gamma	21
1.3.1. Généralités	21
1.3.2. Structure d'IFN- γ et localisation de son gène <i>IFNG</i>	21
1.3.3. Récepteurs d'IFN- γ	22
1.3.4. Signalisation d'IFN	22
1.3.5. Rôle d'IFN- γ	23
1.4. Réaction en chaîne par polymérase (PCR)	24
1.4.1. Définition	24
1.4.2. Principe de PCR	25
1.4.3. Les composants de la PCR	25
1.4.3.1. L'ADN matrice	25
1.4.3.2. Les amorces	25
1.4.3.3. L'ADN polymérase	26
1.4.3.4. Désoxynucléotide triphosphates	26
1.4.3.5. Ions de Mg ²⁺	26
1.4.3.6. Thermocycleur	26
1.4.4. Étapes de la PCR	26
1.4.4.1. Dénaturation	27
1.4.4.2. Hybridation	27
1.4.4.3. Extension	27
1.4.5. Avantages de la PCR	28
1.5. Problématique et objectif	29
1.5.1. Problématique	29
1.5.2. Objectif	29

Table des matières	x
1.5.3. But	29
Chapitre 2. Matériels et méthodes	30
2.1. Conception d'amorces	30
2.2. Conception des amorces pour le gène <i>IFNG</i>	31
2.2.1. Recherche de la séquence du gène <i>IFNG</i>	31
2.2.2. Le design des Primers : Outil Primer-BLAST	33
2.2.3. Confirmation des résultats	36
2.2.3.1. Par <i>in-silico</i> PCR	36
2.2.3.2. Par Primer-BLAST	37
Chapitre 3. Résultats	38
3.1. Résultats de la conception des amorces	38
3.1.1. Résultats du primer-Blast	38
3.1.2. Résultats de la confirmation par <i>in-silico</i> PCR	41
3.1.3. Résultats de la confirmation par Primer-BLAST	44
Chapitre 4. Conclusions et perspectives	48
Chapitre 5. Bibliographie	49

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Structure du LPS de <i>P. aeruginosa</i> .	5
Figure 1.2. Étapes de formation du biofilm chez <i>P. aeruginosa</i> .	6
Figure 1.3. Développement des cellules lymphoïdes innées (ILCs).	13
Figure 1.4. Sous types des cellules lymphoïdes innées (ILCs).	16
Figure 1.5. Plasticité des (ILCs).	18
Figure 1.6. Localisation du gène <i>IFNG</i> sur le chromosome 12 humaine.	22
Figure 1.7. Signalisation d'IFN γ	23
Figure 1.8. Etapes de la réaction en chaîne par polymérase (PCR).	28
Figure 2.1. Plateforme de la base de données Ensembl.	31
Figure 2.2. Résultats de la recherche du gène <i>IFNG</i> .	32
Figure 2.3. Caractéristiques du gène IFNG.	32
Figure 2.4. La séquence du gène IFNG depuis la plateforme « Ensembl ».	33
Figure 2.5. La séquence d'intérêt.	33
Figure 2.6. Plateforme de la base de données NCBI.	34
Figure 2.7. L'outil Primer-Blast.	34
Figure 2.8. L'outil Primer-BLAST.	35
Figure 2.9. Primer Pair Specificity Checking Parameters.	35
Figure 2.10. Confirmation des résultats par la plateforme « UCSC genome browser ».	36
Figure 2.11. Le site In-silico PCR.	36
Figure 2.12. L'outil Primer-BLAST.	37
Figure 3.1. Résultats du Primer-BLAST.	38
Figure 3.2. Primer pair 1.	38
Figure 3.3. Primer pair 6.	38
Figure 3.4. Primer pair 7.	39
Figure 3.5. Primer pair 9.	39
Figure 3.6. Résultats du Primer-BLAST.	40
Figure 3.7. Résultats du primer-BLAST.	40

Figure 3.8. Les amorces encadrant la région d'intérêt.	41
Figure 3.9. Confirmation des résultats sur la plateforme « UCSC genome browser ».	41
Figure 3.10. Résultats de la confirmation pour la première paire d'amorces.	42
Figure 3.11. Résultats de la confirmation pour la première paire d'amorces.	42
Figure 3.12. Résultats de confirmation pour la deuxième paire d'amorces.	43
Figure 3.13. Résultats de confirmation pour la troisième paire d'amorces	43
Figure 3.14. Résultats de la confirmation pour la quatrième paire d'amorces.	44
Figure 3.15. Confirmation des résultats par l'outil <i>Primer-Blast</i> .	44
Figure 3.16. Confirmation des résultats par l'outil <i>Primer-Blast (Primer Pair Specificity Checking Parameters)</i> .	45
Figure 3.17. Résultats de la confirmation pour la première paire d'amorces	45
Figure 3.18. Résultats de confirmation pour la deuxième paire d'amorces.	46
Figure 3.19. Résultats de confirmation pour la troisième paire d'amorces	46
Figure 3.20. Résultats de la confirmation pour la quatrième paire d'amorces.	47

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1. La comparaison entre les critères d'une bonne amorce et nos amorces	39
---	----

Liste des abréviations**A**

ADCC : Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (*Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*)

ADN : Acide désoxyribonucléique (*Deoxyribonucleic acid*)

ADP : Adénosine diphosphate : (*Adenosine diphosphate*)

AHR : Récepteur d'aryl hydrocarbonne (*Aryl hydrocarbon receptor*)

AREG : Amphiréguline (*Amphiregulin*)

ARN : Acide ribonucléique (*ribonucleic*)

C

C1q : Composant du complément 1q (*The complement component 1q*)

cAMP : Adénosine monophosphate cyclique (*Cyclic adenosine monophosphate*)

cCMP : Cytidine monophosphate (*Cyclic cytidine monophosphate*)

CD : Récepteur cluster de différenciation (*Cluster of differentiation*)

Cdc42 : Homologue de la protéine 42 de contrôle de la division cellulaire (*Cell division control protein 42 homolog*)

cGMP : Guanosine monophosphate cyclique (*Cyclic guanosine monophosphate*)

CHILP : Progéniteurs lymphoïdes innés auxiliaires communs (*Common helper innate lymphoid progenitor*)

CILP : Précurseurs lymphoïdes innés communs (*Common innate lymphoid precursor*)

CLP : Progéniteurs lymphoïdes communs (*Common lymphoid progenitors*)

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité (*Major histocompatibility complex*)

Crk : CT10-régulateur de kinase (*CT10-regulator of kinase*)

CRTH2 : Récepteur chemoattractant exprimées sur TH2 (*Chemoattractant receptor-homologous molécule expressed on Th2*)

CSH : Cellules souches hématopoïétiques (*Hematopoietic stem cells*)

CTL : Cellules T cytotoxiques (*Cytotoxic T cell*)

cUMP : Uridine monophosphate cyclique (*Cyclic uridine monophosphate*)

CXCR : Récepteur de chimiokine CXC (*C-X-C chemokine receptor*)

D

DAMP : Modèles moléculaires associés aux dommages (*Damage associated molecular patterns*)

dATP : Adénosine triphosphate

DC : Cellules dendritiques (*Dendritic cell*)

dCTP : Cytidine triphosphate

D-Glc : D-glucose

dGTP : Guanosine triphosphate

dNTP : Désoxynucléotides triphosphates (*Deoxynucleoside triphosphate*)

dTTP : Thymidine triphosphate

E

eEF2 : Facteur d'élongation de traduction 2 eucaryote (*eukaryotic translation elongation factor 2*)

EILP : Premiers progéniteurs lymphoïdes innés (*Early innate lymphoid progenitors*)

EOMES : Éomésodermine (*Eomesodermin*)

EPS : Exopolysaccharides

F

FAS : Facteur activant l'exoenzyme S (*Factor activating exoenzyme S*)

Flt3 : Récepteur de tyrosine kinase de type Fms (*Fms-like tyrosine kinase 3*)

FoxP3 : forkhead box P3

G

GAF : Facteur activé par l'interféron γ (*gamma-activated factor*)

GAP : protéines activatrices de la GTPases (*GTPases activating protein*)

GAS : Éléments du site d'activation de l'interféron gamma (*Gamma interferon activation site*)

GATA 3 : Protéine de liaison GATA 3 (*GATA-binding protein 3*)

GM-CSF : Facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (*Granulocyte macrophage-colony stimulating factor*)

H

Hep : L- glycéro -D- manno –heptose (*L-glycero-D-manno-heptose*)

I

ID2 : Facteur inhibiteur de la liaison à l'ADN 2 (*Inhibitor Of DNA Binding 2*)

IFN- γ : Interféron gamma (*Interferon gamma*)

Ig : immunoglobuline (*immunoglobulin*)

IL : Interleukine (Interleukin)

IL-7R α : Sous-unité alpha du récepteur de l'interleukine-7 (*Interleukin-7 receptor subunit*)

alpha)

ILC : Cellules lymphoïdes innées (*Innate lymphoïde cells*)

ILCP : Précurseurs de cellules lymphoïdes innées (*Innate lymphoid cell precursor*)

ILCregs : Cellules lymphoïdes innées régulatrices (*Regulatory innate lymphoid cells*)

ILFs : Follicules lymphoïdes isolés (*Isolated lymphoid follicles*)

IRF1 : Facteur régulateur de l'interféron 1 (*Interferon regulatory factor 1*)

ISG : Gène stimulé par interféron (*Interferon-stimulated gene*)

J

JAK : Janus kinase

K

KDO : Acide 3-désoxy-D-manno-oct-2-ulosonique (*3-Deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid*)

L

LB : lymphocytes B (*B lymphocytes*)

LPS : Lipopolysaccharide

LTi : Cellules inductrices de tissus lymphoïdes (*Lymphoïde tissue inducer cells*)

M

MD2 : Facteur de différenciation myéloïde 2 (*Myeloid differentiation factor 2*)

N

NCR : Récepteurs naturels cytotoxiques (*Natural cytotoxicity receptor*)

NFIL3 : Facteur nucléaire il-3 induit (*Nuclear factor il3 induced*)

NK : Cellules tueuses naturelles (*Natural killer*)

NKT : Cellules T tueurs naturels (*Natural killer T*)

NO : Oxyde nitrique (*Nitric oxide*)

O

O-antigène : Oligosaccharide distal hydrophile répétitif (*The repetitive hydrophilic distal oligosaccharide*)

OMS : Organisation Mondiale de la Santé (*The world health organization*)

P

P. aeruginosa : Pseudomonas aeruginosa

PAMP : Modèles moléculaires associés agents pathogènes (*Pathogen associated molecular*

patterns)

PCN : Pyocyanine

PCR : Réaction en chaîne par polymérase (*Polymerase chain reaction*)

PLCs : phospholipases C

PLZF : Doigt de zinc de la leucémie promyélocytaire (*Promyelocytic leukaemia zinc finger*)

R

RAG : Gènes activant la recombinaison (*Recombination-activating genes*)

ROR α : Récepteur alpha orphelin lié à RAR (*related orphan receptor alpha*)

ROR γ t : Gamma du récepteur orphelin lié à RAR (*RAR-related orphan receptor gamma*)

ROS : Espèces réactives de l'oxygène (*Reactive oxygen species*)

RT-PCR : Réaction en chaîne par polymérase par transcription inverse (*Reverse transcription polymerase chain reaction*)

S

Sox4 : Facteur de transcription contenant la boîte SRY (*SRY-box containing transcription factor*)

STAT1 : Transducteur de signal et activateur de transcription 1 (*Signal transducer and activator of transcription 1*)

T

T3SS : Système de sécrétion de type III (*Type III secretion system*)

T-bet : Facteur de transcription T-box exprimée dans les cellules T (*T-box-expressed-in-T cells*)

TCF-1 : Facteur 1 des lymphocytes T TF (*T cell factor 1*)

TCF1 : Facteur de lymphocytes T (*T cell factor 1*)

TCR : Récepteur des lymphocytes T (*T cell receptor*)

TF : Facteurs de transcription (*Transcription factors*)

TGF- β : Facteur de croissance transformateur bêta (*Transforming growth factor*)

Th : Cellule T auxiliaire (*T helper cell*)

TLR4 : Récepteur de type Toll 4 (*Toll-like receptor 4*)

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale alpha (*Tumor necrosis factor*)

TRAIL : Ligand induisant l'apoptose lié au TNF (*Related apoptosis-inducing ligand*)

α LP : Précurseur α -lymphoïde (*α -lymphoid precursor*)

Introduction

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) est une bactérie à Gram négatif, pathogène opportuniste qui provoque une série d'infections aiguës et chroniques compliquées (Thi, Wibowo, et Rehm 2020; Killough, Rodgers, et Ingram 2022a). Cette bactérie caractérisée par sa capacité d'adaptation à nouvelles conditions environnementales, et à sa haute résistance aux réponses immunitaires innée et adaptative de l'hôte, en raison de son arsenal de facteurs de virulence responsables de la colonisation bactérienne et l'invasion de l'hôte (Yong et al. 2018; Liao et al. 2022; Killough, Rodgers, et Ingram 2022b).

Les cellules lymphoïdes innées (ILC, *Innate lymphoid cells*) sont les constituants du système immunitaire inné les plus récemment identifiés. Sont une population homologues innées des cellules CD4 + T auxiliaires (Th) en fonction de la similitude de leur développement et de leurs fonctions, mais n'expriment pas de récepteurs spécifiques à l'antigène des lymphocytes T ou des lymphocytes B (Artis et Spits 2015; M. Zheng et Zhu 2022a). Sur la base de l'expression du facteur de transcription principal et de la sécrétion de cytokines signature, les ILC sont divisées en trois sous populations, qui sont les ILC1 « comme le font les lymphocytes T auxiliaire de type 1 (Th1, *T helper cell*) », les ILC2 « comme le font les lymphocytes Th2 » et les ILC3 « comme les lymphocytes Th17/Th22 » (Crinier et al. 2017a; M. Zheng et Zhu 2022b). Les cellules du groupe 1 (ILC1) dépendent du facteur de transcription T-bet, et caractérisées par leur capacité à sécréter de l'interféron γ (IFN- γ) et du facteur de nécrose tumorale (TNF)- α . Les cellules du groupe 2 (ILC2) nécessitent GATA3, et génèrent des cytokines de cellules T auxiliaires (Th2) de type 2, telles que l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-13. Les cellules du groupe 3 (ILC3) dépendent du récepteur orphelin γ t (ROR γ t), et produisent de l'IFN- γ , de l'IL-17 et de l'IL-22 (S. Wang et al. 2017; Nagasawa, Spits, et Ros 2018a). Les ILCs jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie et la réparation des tissus. Ainsi, ils représentent de nouveaux acteurs à l'interface entre le microbiote et le système immunitaire inné ou adaptatif (Serafini et Di Santo 2015; Hsu et al. 2021). Les ILC, spécifiquement les ILC1s et les ILC3s, par leur capacité à produire l'IFN- γ , sont considérés comme un élément crucial dans la défense immunitaire contre les infections bactériennes (seo Seo, Giles, et Kronenberg 2020; Beck, Ohno, et Satoh-Takayama 2020a; N. M. Elemam et al. 2021).

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) est une technique de biologie moléculaire, conduisent à l'amplification de l'ADN contient la région spécifique d'intérêt pour générer des plusieurs copies d'un fragment d'ADN spécifique, grâce à des cycles répétés de dénaturation, d'hybridation d'amorce et d'extension effectués avec l'enzyme thermostable (Gibbs 1990; Kadri 2020a; Bell 1989). L'étude de l'expression de l'IFN- γ par PCR permet d'identifier la

Introduction

Sous-population d'ILCs qui produit cette cytokine lors d'une infection par *aeruginosa*, ainsi que d'étudier l'implication de cette cytokine dans la défense contre cette bactérie.

Notre travail consiste à élaborer des amorces qui serviront à amplifier la séquence d'oligonucléotides encadrant l'exon 1 du gène *IFNG* exprimé par les ILCs qui contribue à la lutte contre d'infection bactérienne par *P. aeruginosa*.

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Le nom de la bactérie *Pseudomonas* est dérivé de deux mots grecs : pseudo, signifiant « erreur », et monas, signifiant « une unité » ; *aeruginosa* « bleu verdâtre » vient du mot latin aerūgō qui signifie « cuivre rouillé » (Diggle et Whiteley 2020a). La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) a été connue sous plusieurs noms tout au long de son histoire et depuis sa découverte, en raison de la couleur bleue et verte qu'elle produit. Sédillot fut le premier à le découvrir en 1850 en observant le changement de couleur et d'odeur des pansements chirurgicaux (Lister, Wolter, et Hanson 2009), et le pharmacien Français Carle Gessard fut le premier à décrire *P. aeruginosa* dans son étude « Sur la couleur bleu-vert des bandages » en 1882. Il a réussi à isoler la bactérie en culture pure et a signalé sa croissance à partir de plaies cutanées de deux patients infectés par du pus vert bleuâtre (Lister, Wolter, et Hanson 2009; Diggle et Whiteley 2020).

1.1.1. Caractéristiques de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa, bacille pyocyanine, est une bactérie pathogène opportuniste, aérobie, en forme de bâtonnet, et à Gram négatif (0,5-0,8 µm de diamètre, et 1,5-8 µm de long). Cette bactérie est mobile par flagelles polaires et trouvé seul, en paires ou en chaînes courtes dépourvu de spores et de capsules. Elle possède une oxydase positive et appartient à la famille des « Pseudomonadaceae » (Bennik 1999; Azam et Khan 2019).

Le génome de *P. aeruginosa* est relativement volumineux par rapport à d'autres bactéries (5,5 à 7 Mbp) (Pang et al. 2019a).

La température optimale de croissance est de 37 °C, mais il peut survivre dans des températures allant de 4 à 42 °C (Diggle et Whiteley 2020b).

1.1.2. Habitat de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa est un germe ubiquitaire, abondant dans le sol, l'eau et la végétation. Cette bactérie peut être isolée à partir de la peau, de la gorge et des excréments de personnes en bonne santé. Elle colonise souvent la nourriture, les éviers, les robinets, les vadrouilles et les équipements respiratoires des hôpitaux (Iglewski 1996).

1.1.3. Facteur de pathogénicité de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa possède un large éventail de facteurs de virulence qui contribuent à sa pathogénicité. Ces facteurs sont également impliqués à l'attachement bactérien, à la colonisation et à l'invasion de l'hôte, à l'interruption de l'intégration des tissus de l'hôte, à la

suppression et à l'échappement aux défenses immunitaires de l'hôte et à l'épuisement des tissus de l'hôte (Moradali, Ghods, et Rehm 2017; Sainz-Mejías, Jurado-Martín, et McClean 2020; Liao et al. 2022).

1.1.3.1. Facteurs de virulence de surface

1.1.3.1.1. Les pili ou fimbriae

Plusieurs bactéries possèdent des appendices superficiels filamenteux appelés pili (Craig, Forest, et Maier 2019). Il y a plusieurs types de pili, qui diffèrent en fonction de leurs mécanismes d'assemblage, leur structure et leur fonction et parmi eux (Pelicic 2008; Burdman et al. 2011a).

Le pili de type IV de *P. aeruginosa* est un homopolymère constitué de plusieurs milliers de copies d'une sous-unité protéique de 15 kDa appelée pilin (PilA) (Hahn 1997; Nudleman et Kaiser 2004). Ces unités sont assemblées par divers composants, tels que les protéines PilC, PilB et PilT (Nudleman et Kaiser 2004). Le pili de type IV est impliqué dans plusieurs fonctions, notamment la motilité, l'adhésion et la colonisation de surface, la formation de biofilm, l'absorption de l'ADN et la virulence (Nudleman et Kaiser 2004; Burdman et al. 2011b).

1.1.3.1.2. Flagelle

Les flagelles sont des organites bactériens très complexes, essentiels à l'attachement initial de *P. aeruginosa* aux surfaces (Haiko et Westerlund-Wikström 2013; Tuon et al. 2022). Les flagelles sont impliqués la chimiotaxie, la motilité, la formation de biofilm et la virulence (Haiko et Westerlund-Wikström 2013; Bouteiller et al. 2021).

1.1.3.1.3. Lipopolysaccharide

Le lipopolysaccharide (LPS) est un composant important de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Il est divisé en trois régions : le lipide A (le domaine hydrophobe, qui est une endotoxine et le principal facteur de virulence), et l'oligosaccharide distal hydrophile répétitif (O-antigène, *The repetitive hydrophilic distal oligosaccharide*), et le polysaccharide de noyau hydrophile (le polysaccharide central) (Figure 1.1) (Mazgaeen et Gurung 2020; Farhana et Khan 2024).

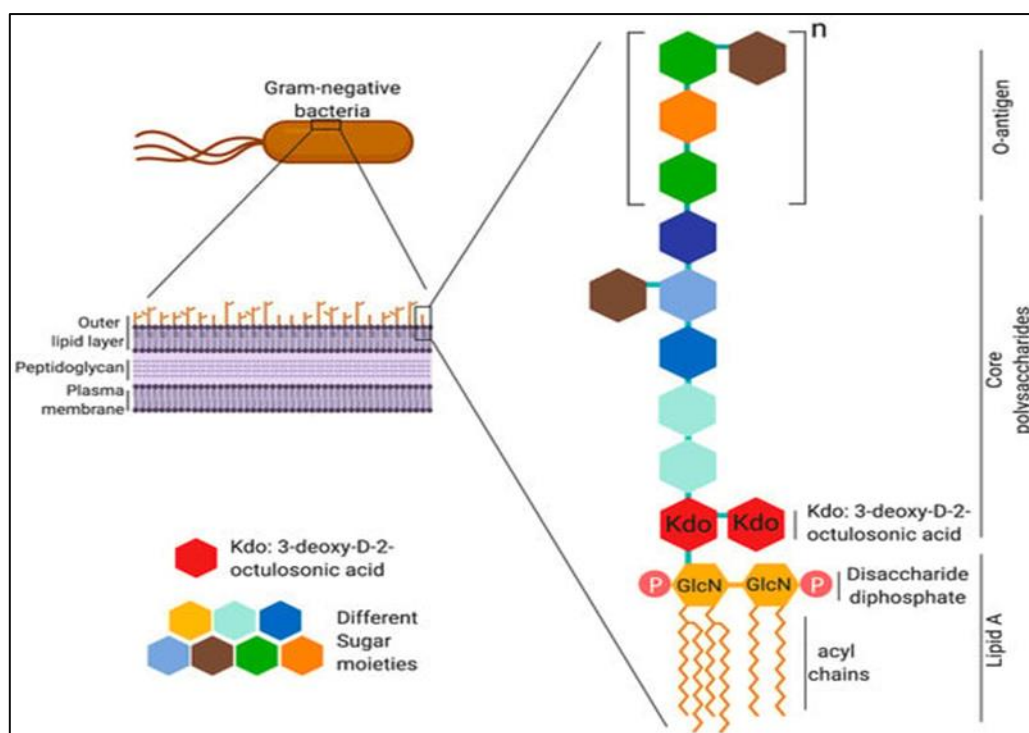


Figure.1.1. Structure du LPS de *P. aeruginosa* (Mazgaeen et Gurung 2020). Le LPS assure l'intégrité structurelle et fonctionnelle de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Le LPS est une molécule amphipathique avec une structure générale composée de trois régions différentes : le lipide hydrophobe A, le polysaccharide central et l'antigène O (répétitions de la chaîne polysaccharidique, où n peut aller jusqu'à 40 répétitions). Le lipide A est constitué d'un squelette diglucosamine bisphosphorylé substitué par six chaînes acyle attachées par une liaison ester ou amide.

Le lipide A (endotoxine), l'ancre hydrophobe du lipopolysaccharide (LPS), est un phospholipide à base de glucosamine qui constitue la monocouche externe des membranes externes de la plupart des bactéries à Gram négatif (Gauthier, Rotjan, et Kagan 2022). Il constitue la partie bioactive du LPS, activant le système immunitaire inné *via* le récepteur Toll-like 4/ facteur de différenciation myéloïde 2 (TLR4/MD2) (Delcour 2013).

L'antigène O est le long composant polysaccharidique du LPS, dont la longueur peut varier d'un à plusieurs centaines de sucres. Il est synthétisé séparément du noyau lipidique A et y est ensuite attaché (Huszczynski, Lam, et Khursigara 2019).

La région oligosaccharidique centrale du LPS est attachée au lipide A, et subdivisée en noyau interne qui contient du L- glycéro -D- manno -heptose (Hep, *L-glycero-D-manno-heptose*) et d'acide 3-désoxy-D-manno-oct-2-ulosonique (KDO, *3-Deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid*), et un noyau externe qui est composé de sucres hexoses, tels que D-glucose (D-Glc), le galactose, la N -acétylgalactosamine et la N -acétylglucosamine, et est généralement plus variable que le noyau interne (Rocchetta, Burrows, et Lam 1999; Erridge, Bennett-Guerrero, et Poxton 2002). Les résidus Hep sont souvent phosphorylés en positions 2, 4 et 6. Il convient de noter que la phosphorylation du noyau interne du LPS de *P. aeruginosa* est essentielle à la viabilité bactérienne (Pier 2007).

1.1.3.1.4. Biofilm

Les biofilms sont un complexe de cellules microbiennes intégrées dans une matrice extracellulaire composée de protéines, d'ADN extracellulaire et d'exopolysaccharides, offrant un mode de vie protecteur aux bactéries (Kamali et al. 2020). La formation du biofilm comprend les étapes suivantes (figure 1.2) (Passos Da Silva et al. 2017) :

(a) la fixation initiale ou adhérence des cellules bactériennes à une surface par le support d'appendices cellulaires tels que les flagelles et les pili de type IV (Thi, Wibowo, et Rehm 2020; Vetrivel et al. 2021).

(b) Les cellules bactériennes passent d'une fixation réversible à une fixation irréversible (Thi, Wibowo, et Rehm 2020).

(c) Propagation progressive des bactéries attachées dans une architecture plus structurée, appelée microcolonies (Thi, Wibowo, et Rehm 2020).

(d) Pendant ce temps, on observe la croissance de communautés tridimensionnelles, et par conséquent la maturation du biofilm (Thi, Wibowo, et Rehm 2020).

(e) Enfin, les bactéries se dispersent de la structure sessile et rentrent à l'état planctonique pour se propager et coloniser d'autres surfaces (Rasamiravaka et al. 2015).

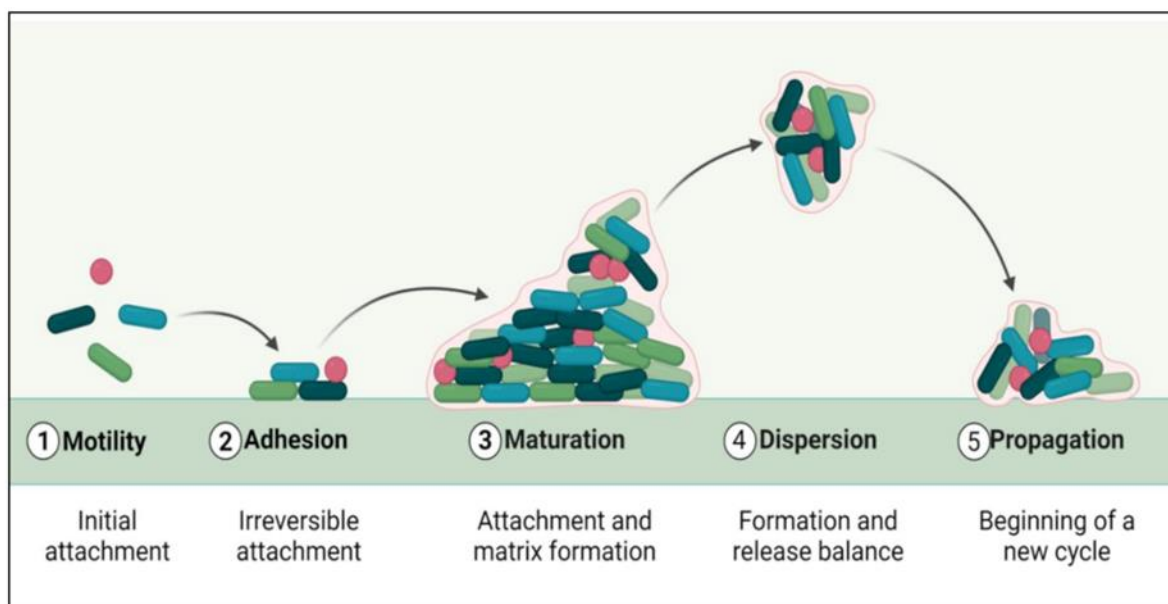


Figure 1.2. Étapes de formation du biofilm chez *P. aeruginosa* (Asma et al. 2022).

La stabilité de la structure du biofilm de *P. aeruginosa* est déterminée par divers polysaccharides, notamment l'alginate, le pel et le psl (Vetrivel et al. 2021).

1.1.3.2. Facteurs de virulence sécrétés

1.1.3.2.1. Exotoxine A

L'exotoxine A est la plus toxique des protéines sécrétées produites par *P. aeruginosa*. Cette exotoxine possède une activité d'adénosine diphosphate (ADP, *Adenosine diphosphate*) -ribosylation et affecte les processus de synthèse des protéines dans les cellules hôtes (Jurado-Martín, Sainz-Mejías, et McClean 2021) (Wagener et al. 2021). Elle est composée de 613 acides aminés et subdivisée en trois domaines structurels importants : Le domaine I qui est domaine N-terminal et composé principalement de brins β antiparallèles et est responsable de la fixation aux cellules hôtes ; le domaine intermédiaire ou central (II), composé de six hélices α ayant une activité de translocation membranaire qui permet à ce toxine de se déplacer à travers les membranes cellulaires ; et le domaine C-terminal (III) qui est le fragment toxique avec une activité ADP-ribosyltransférase (Wick, Hamood, et Iglewski 1990; Wedekind et al. 2001; Michalska et Wolf 2015; Jurado-Martín, Sainz-Mejías, et McClean 2021).

Après son libération par *P. aeruginosa*, l'exotoxine A se lie aux cellules hôtes *via* le récepteur cluster de différenciation 91 (CD91, *cluster of differentiation*) ou $\alpha 2$ -macroglobuline, conduisant à son internalisation dans les endosomes et à sa translocation ultérieure vers le cytosol, où grâce à son activité enzymatique ADP-ribosylation, elle inactive le facteur d'élongation de traduction 2 eucaryote (eEF2, *eukaryotic translation elongation factor 2*) et cela arrête la synthèse des protéines au niveau de l'élongation de la chaîne polypeptidique, entraînant la mort cellulaire (Wick, Hamood, et Iglewski 1990; Shapira et Benhar 2010).

1.1.3.2.2. Exoenzymes S, T, U et Y

La bactérie *P. aeruginosa* utilise un appareil de sécrétion complexe de type III (T3SS) pour injecter des protéines effectrices dans les cellules hôtes (Hauser 2009). Ce T3SS forme des machines complexes en forme d'aiguilles sur la surface bactérienne et injecte des toxines directement dans le cytoplasme des cellules cibles (Hauser 2009; Sauvage et Hardouin 2020; Jurado-Martín, Sainz-Mejías, et McClean 2021; Wagener et al. 2021).

L'ExoS et l'ExoT sont des cytotoxines bifonctionnelles de *P. aeruginosa*, qui partagent 76% d'homologie protéique et contiennent des domaines protéines activatrices des GTPases (GAP, *GTPases activating protein*) N-terminaux et des domaines ADP-ribosylation C-terminaux (Barbieri et Sun 2005).

Les activités GAP d'ExoS et ExoT semblent être identiques, ciblant Rho, Rac et l'homologue de la protéine 42 de contrôle de la division cellulaire (Cdc42, *Cell division control protein 42 homolog*) petites GTPases qui maintient l'organisation du cytosquelette d'actine (Barbieri et Sun 2005). Ces GTPases régulatrices basculent normalement entre une forme

active liée au GTP et une forme inactive liée au GDP, mais le domaine GAP des ExoS et ExoT, biaise le passage vers la forme inactive liée à l'ADP, provoquant une perturbation de l'actine du cytosquelette (Hauser 2009).

L'activité ADP-ribosyltransférase d'ExoS qui cible Ras et plusieurs autres protéines, dépend d'un cofacteur eucaryote (FAS, *factor activating exoenzyme S*), et possède un certain nombre d'effets indésirables sur la cellule hôte, notamment la mort cellulaire, la perturbation du cytosquelette et l'inhibition de la synthèse de l'ADN (Goehring et al. 1999; Hauser 2009). L'ExoT possède une activité ADP-ribosyltransférase limitée et affecte l'activité phagocytaire de la cellule hôte. Elle cible les protéines adaptatrices Crk qui sont essentielles dans la transduction du signal et la réorganisation de l'actine (Yahr, Barbieri, et Frank 1996; Sun et Barbieri 2003; Kipnis, Sawa, et Wiener-Kronish 2006). L'activité GAP de l'ExoT peut aussi inhiber la réparation des plaies épithéliales (Geiser et al. 2001).

L'exotoxine Y est une adénylate cyclase soluble qui synthétise divers nucléotides cycliques « Adénosine monophosphate cyclique (cAMP, *cyclic adenosine monophosphate*), Cytidine monophosphate (cCMP, *cyclic cytidine monophosphate*), Guanosine monophosphate cyclique (cGMP, *cyclic guanosine monophosphate*) et Uridine monophosphate cyclique (cUMP, *cyclic uridine monophosphate*) » ce qui provoque une dégradation irréversible des microtubules d'actine, une altération de l'intégrité de la barrière endothéliale et un dysfonctionnement des organes cibles (Jurado-Martín, Sainz-Mejías, et McClean 2021; Wagener et al. 2021).

Enfin, l'ExoU possède une puissante activité phospholipase qui est capable de provoquer une mort cellulaire rapide dans les cellules eucaryotes. Contrairement à la destruction cellulaire induite par ExoS et l'ExoT, la mort provoquée par l'ExoU est caractérisée par une perte rapide (en 1 à 2 heures) de l'intégrité de la membrane plasmique (Hauser 2009).

1.1.3.2.3. Protéase

P. aeruginosa sécrète une protéase alcaline, AprA (codé par le gène *AprA*) et deux élastases (A et B) qui ont été décrites comme des exoenzymes et des facteurs de virulence. Ces protéases jouent un rôle important dans les lésions tissulaires (Engel et al. 1998).

AprA et l'élastase sont des métalloprotéases de zinc qui nécessitent des ions calcium pour leur stabilité (Casilag et al. 2016).

L'élastase (33 kDa) clive plusieurs protéines de l'hôte, comme les protéines du complément, le collagène et les immunoglobuline G (IgG, *immunoglobulin G*) et IgA, Tandis que l'AprA (50 kDa) dégrade divers composants du système immunitaire de l'hôte, comme des cytokines « (l'interféron gamma (IFN- γ , *Interferon gamma*), le facteur de nécrose tumorale

alpha (TNF- α , *Tumor necrosis factor*), et l'interleukine 6 (IL-6, *Interleukin 6*) » et les compléments « composant du complément 1q (C1q, *The complement component 1q*) , C3 et C2 » (Laarman et al. 2012).

1.1.3.2.4. Phospholipase

P. aeruginosa produit des phospholipases C (PLCs) extracellulaires homologues, un PLC hémolytique (PlcH) et un PLC non hémolytique (PlcN) et Plc B (Barker et al. 2004).

Les trois PLC hydrolysent la phosphatidylcholine, le composant principal des membranes cellulaires, ainsi que d'autres phospholipides des membranes : la sphingomyéline ciblé par la PlcH, la phosphatidylsérine hydrolysé par PlcN, et la phosphatidyléthanolamine par PlcB (Constantino-Teles et al. 2022). PlcN et PlcB ont un rôle dans la formation du biofilm de *P. aeruginosa* (Lewenza et al. 2017).

1.1.3.2.5. Pyocyanine

La pyocyanine (PCN) est un facteur de virulence et métabolite secondaire pigmenté chimiquement fascinant et biologiquement important (Parsons et al. 2007). *P. aeruginosa* produit en grande quantité de la pyocyanine (N-méthyl-1-hydroxyphénazine), qui est un pigment de couleur bleu-vert phénazine soluble dans l'eau (DeBritto et al. 2020). La PCN produit par *P. aeruginosa* peut induire une cytotoxicité, grâce à l'induction du stress oxydatif, ce qui provoque la mort cellulaire en affectant principalement les voies urinaires, le système cardiovasculaire et le système nerveux central (Hall et al. 2016).

1.1.3.2.6. Métallophores

P. aeruginosa peut survivre dans l'hôte dans des conditions de pénurie de métaux, grâce à la production des métallophores. Il sécrète trois types de métallophores, deux pour la chélation du fer (sidérophores) nommés pyoverdine et pyochelin et le troisième (pseudopaline) qui peut chélater le zinc, le nickel et le cobalt (Ghssein et Ezzeddine 2022).

La pyoverdine est le principal sidérophore dans la capacité de collecte du fer produit par *P. aeruginosa*, et il joue un rôle essentiel dans la régulation de la production d'autres facteurs de virulence comme l'exotoxine A (Meyer et al. 1996; Lamont et al. 2002).

En plus du fer qui est essentiel à la croissance et à la survie de *P. aeruginosa*, le zinc et aussi joue un rôle important dans sa virulence, la colonisation de l'organisme hôte et la résistance aux antibiotiques, ainsi qu'à l'activité des protéases (Ochsner et al. 2002; Ghssein et Ezzeddine 2022).

1.4. Épidémiologie

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, *The world health organization*) a classé *P. aeruginosa* parmi les trois principaux agents pathogènes critiques nécessitant des recherches urgentes sur de nouveaux traitements (Killough, Rodgers, et Ingram 2022).

P. aeruginosa une cause fréquente d'infections nosocomiales, à l'origine de 8,4 % .est la troisième bactérie responsable d'infections nosocomiales, après *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (Cabrolier, Lafolie, et Bertrand 2014; Bhardwaj et al. 2021).

L'infection par *P.aeruginosa* est particulièrement répandue chez les patients atteints de pneumonie, les personnes immunodéprimés, et chez ceux atteints d'une maladie pulmonaire telle que la mucoviscidose (Reynolds et Kollef 2021)

P. aeruginosa peut infecter et coloniser presque tous les systèmes corporels chez l'homme, mais les yeux, le cœur, le système nerveux central, les os et les articulations font partie des sites où les risques d'infection augmentent le taux de morbidité et de mortalité (Bhardwaj et al. 2021; Killough, Rodgers, et Ingram 2022b).

1.5. Résistance aux antibiotiques

P. aeruginosa possède une résistance à de nombreux antibiotiques limitant le nombre de thérapeutiques efficaces (A. Bousquet 2018). Les mécanismes de résistance dans *P.aeruginosa* contre les antibiotiques peut être intrinsèque, extrinsèque (acquise) ou adaptative (Mazhar Ali et al. 2020).

1.5.1. Résistance intrinsèque

La résistance intrinsèque d'une bactérie à un antibiotique particulier est due en raison de caractéristiques structurelles ou fonctionnelles (Blair et al. 2015). La résistance intrinsèque chez la *P. aeruginosa*, est due 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 telles que les β -lactamases (Pang et al. 2019).

1.5.2. Résistance acquise

Les bactéries peuvent acquérir une résistance aux antibiotiques grâce à des changements mutationnels ou à l'acquisition de gènes de résistance où l'ADN bactérien peut être transféré d'une bactérie à une autre *via* la transformation (incorporation d'ADN libérés dans l'environnement), la transduction (par les bactériophages) ou la conjugaison (par contact physique direct entre la cellule donneuse et la cellule receveuse) (Munita et Arias 2016a; 2016b; Pang et al. 2019b).

Cavalcanti et ces collaborateurs ont montré que *P. aeruginosa* est plus susceptible d'accumuler des mutations, après l'inactivation du système de réparation de l'ADN, ce qui entraîne une production accrue de β -lactamase et une surexpression de des pompes d'efflux (Mandsberg et al. 2009). *P. aeruginosa* peut aussi acquérir des gènes étrangers codant pour les β -lactamases, capables d'inactiver les carbapénèmes (Cavalcanti et al. 2015).

1.5.3. Résistance adaptative

Chez *P. aeruginosa*, la formation de biofilms est la stratégie la plus courante pour acquérir une résistance adaptative aux antibiotiques (Qin et al. 2022). Des études ont montré que les bactéries qui manquent de résistance intrinsèque ou acquise peuvent devenir moins sensibles aux antibiotiques lorsqu'elles se développent dans un biofilm (Pang et al. 2019).

1.2. Les cellules lymphoïdes innées

1.2.1. Découverte et nomenclature

Dès les années 1970 et au début des années 2000, les premiers membres fondateurs de la famille lymphoïde innée sont découvertes, les cellules tueuses naturelles (NK, *Natural killer*) et les cellules inductrices de tissus lymphoïdes (*LTi*, *Lymphoïde tissue inducer cells*), respectivement (Q. Huang, Seillet, et Belz 2017) (Shin et McNagny 2021a).

Entre 2008 et 2010, des nouveaux sous-populations de cellules d'origine lymphoïde appelées cellules lymphoïdes innées (ILC, *Innate lymphoid cells*), ont été identifiées par plusieurs laboratoires (Cypowyj et Vivier 2016). La nomenclature des ILC proposée en 2013 a classé ces cellules en 3 groupes selon les cytokines qui les produisent, leur développement et leurs fonctions qui dépendent à des facteurs de transcription (Vivier et al. 2018a).

1.2.2. Ontogénie

Les ILCs et leurs progéniteurs sont situés dans les tissus et le sang (Q. Liu et al. 2022). Ces progéniteurs sont dérivés de cellules souches hématopoïétiques (CSH) (Golub et Cumano 2013).

Le développement des ILCs se fait à partir à des progéniteurs lymphoïdes communs (CLP, *Common lymphoid progenitors*), qui ont la capacité de générer des sous-ensembles ILC, ainsi que des lymphocytes T et des lymphocytes B (LB, *B lymphocytes*), même si les NK (Hernández-Torres et Stehle 2022).

Plusieurs facteurs de transcription (TF) sont impliquant dans le développement, en particulier : le facteur inhibiteur de la liaison à l'ADN 2 (ID2, *Inhibitor Of DNA Binding 2*), le facteur nucléaire il-3 induit (NFIL3, *Nuclear factor il3 induced*), doigt de zinc de la leucémie promyélocytaire (PLZF, *promyelocytic leukaemia zinc finger*), le facteur de lymphocytes T

(TCF1, T cell factor 1), la protéine de liaison GATA 3 (GATA-3, GATA-binding protein 3), le T-box exprimée dans les cellules T (T-bet, T-box-expressed-in-T cells), l'éoméso dermine (EOMES, Eomesodermin), récepteur d'aryl hydrocarbonne (AHR, *Aryl hydrocarbon receptor*) et ROR γ t (C. Liu et al. 2021). AHR et ROR γ t stimulent l'engagement, la spécification et la maturation des ILC provenant de progéniteurs lymphoïdes pour la naissance les sous populations (C. Liu et al. 2021).

Les ILCs sont des homologues aux lymphocytes T, mais ne contiennent pas des récepteurs antigéniques adaptatifs générés par la recombinaison d'éléments génétiques (Vivier et al. 2018b). Ils sont indépendants des ADN recombinants codés par des gènes activant la recombinaison (RAG, *Recombination-activating genes*) (Ghaedi et Takei 2021).

Les CLP se caractérisent par l'expression du c-kit (117), du récepteur de tyrosine kinase de type Fms (Flt3, *Fms-like tyrosine kinase 3*), et de CD127 « ou encore appelée la sous-unité alpha du récepteur de l'interleukine-7 (IL-7R α , Interleukin-7 receptor subunit alpha) » à leur surface. Le ligand l'IL-7 de ce dernier récepteur est très important, lors du développement des ILC (Crinier et al. 2017a; Ghaedi et Takei 2021). Les CLP produits, sont à l'origine de de deux populations qui ont perdu la capacité de se différencier en lymphocytes adaptatifs : les premiers progéniteurs lymphoïdes innés (EILP, *early innate lymphoid progenitors*) et les précurseurs lymphoïdes innés communs (CILP, *common innate lymphoid precursor*) « aussi appelés précurseur α -lymphoïde (α LP, *α -lymphoid precursor*). Les CILP se distinguent de leurs précurseurs par l'absence de Flt3, et l'expression de l'intégrine int α 4 β 7+ à leur membrane, et du récepteur de chimiokine CXCR6 de type 6 (CXCR6, *C-X-C chemokine receptor type 6*) (Crinier et al. 2017b; Da 2016). Les L'EILP sont caractérisées par l'expression du facteur 1 des lymphocytes T TF (TCF-1, *T cell factor 1*), et identifiées comme (– CD127 , int α 4 β 7 +) (Seillet et al. 2016; Klose et Artis 2020).

Les α LP peut produire les cellules NK et tous les types d'ILC (ILC1, ILC2 et ILC3) (Stier et Peebles 2020a). Les progéniteurs lymphoïdes innés auxiliaires communs (CHILP, *common helper innate lymphoid progenitor*) identifié par Id2 + CD127 + CD25 – α 4 β 7 + et expriment des niveaux variables de PLZF (Eberl et al. 2015; Scoville, Freud, et Caligiuri 2019). Mais contrairement à l'EILP ou à l' α LP, ils ne peuvent générer que des cellules ILC1, ILC2, ILC3 et LTi (Korchagina et al. 2023). Les précurseurs de cellules lymphoïdes innées (ILCP, *Innate lymphoid cell precursor*) sont encore plus restreints, n'ayant pas la capacité de générer des cellules LTi (Stier et Peebles 2020b), mais ils ont la capacité de donner les ILC1, les ILC2 et ILC3 par (Korchagina et al. 2023). La figure 1.3 représente le développement des ILCs.

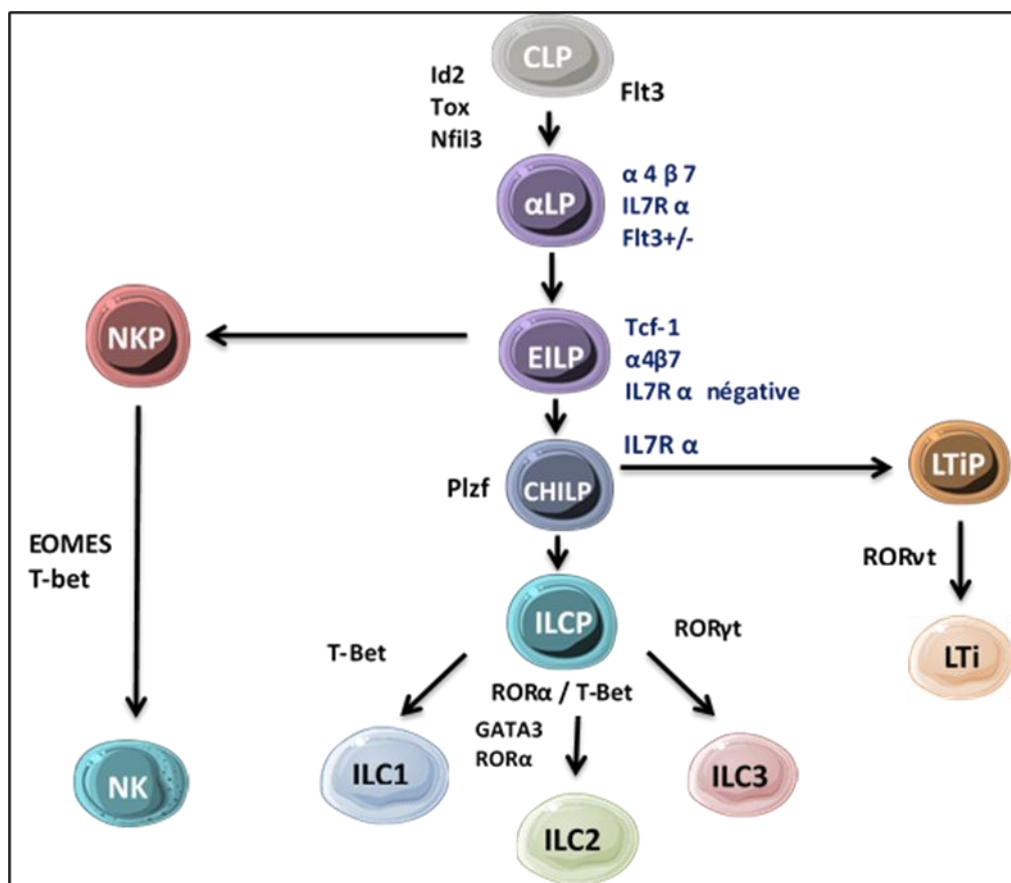


Figure 1.3. Développement des cellules lymphoïdes innées (ILCs) (Shi et al. 2022; Van De Pavert 2023). L'ontogenèse commence avec le progéniteur lymphoïde commun (CLP) à partir duquel est issu le premier précurseur dédié à l'ILC, l' α LP. Du premier progéniteur lymphoïde inné (EILP), le précurseur NK (NKP) naît, tandis que du progéniteur lymphoïde commun (CHILP), la lignée de l'inducteur de tissu lymphoïde (LTi) se différencie. Le progéniteur de cellules lymphoïdes innées (ILCP) donne naissance aux ILC1, 2 et 3, médiés par les facteurs de transcription ROR α et T-Bet. Les facteurs de transcription et les cytokines impliqués dans la différenciation d'un type cellulaire spécifique sont indiqués à côté des flèches. Il existe trois principaux types d'ILC3, les NCR+, les NCR- et les cellules LTi. ILC, cellule lymphoïde innée ; CLP, progéniteur lymphoïde commun ; l' α LP, précurseur α -lymphoïde ; EILP, progéniteur lymphoïde intermédiaire précoce ; NKP, le précurseur NK ; CHILP, progéniteur lymphoïde commun ; ILCP, le progéniteur de cellules lymphoïdes innées ; LTiP, progéniteur de cellules inductrices de tissus lymphoïdes LTi ; le cellule inductrice de tissus lymphoïdes ; TOX, la protéine de boîte de groupe à haute mobilité associée à la sélection des thymocytes TOX ; ID2, inhibiteur de la liaison à l'ADN 2 ; Nfil3, le facteur nucléaire régulé par l'interleukine 3 ; TCF-1, facteur de lymphocytes T ; PLZF, doigt de zinc de la leucémie promyélocytaire ; IL-7R α , la sous-unité alpha du récepteur de l'interleukine-7 ; α 4 β 7, l'intégrine alpha 4 bêta 7 ; T-bet, T-box-exprimée dans les cellules T ; ROR γ t, le facteur de transcription gamma du récepteur orphelin lié à RAR ; GATA3, protéine de liaison GATA 3 ; ROR α , le récepteur orphelin lié à RAR ; EOMES, Éomésodermine ; NK, les cellules tueuses naturelles.

1.2.3. Sous populations

Les ILCs sont classées en fonction des facteurs de transcription qui déterminent leur différenciation, des cytokines qu'elles sécrètent et de leurs critères phénotypiques (figure 1.4) (Narinyan et al. 2022).

1.2.4.1. ILC1 du groupe 1

Les ILCs du groupe 1 comprennent les ILC1s et les cellules NK, qui partagent certains points communs : comme l'expression des récepteurs naturels cytotoxiques (NCR, *Natural cytotoxicity receptor*) à leur surface « CD56, NKp44 (NCR2, CD336), CD161, NKp46 (NCR1, CD335) chez l'homme et (NK1.1, NKp46) chez la souris », l'expression de facteur de transcription T-bet, et la libération des granzymes, d'IFN- γ et TNF- α) (Bank et al. 2020; Taggenbrock et Van Gisbergen 2023a). Cependant, les ILC1s sont différents des cellules NK, car elles n'ont pas l'expression de la perforine, ainsi que des marqueurs de cellules NK (CD16 et CD94), qui entraînent moins de cytotoxicité que les cellules NK, et manquent d'expression du facteur de transcription Éomésodermine (Eomes, *Eomesodermin*) (Cypowyj et Vivier 2016; Simoni et Newell 2018; M. Zheng et Zhu 2022b).

1.2.4.1.1. Les cellules NK

Les cellules NK, trouvées notamment dans la circulation sanguine, représentent 5 à 15 % des lymphocytes sanguins chez l'homme et 2 à 5 % chez la souris (Seillet, Brossay, et Vivier 2021; Jacquelot et al. 2021). Leurs développements nécessitent les facteurs de transcription Eomes (l'éomésodermine) et T-bet (Bank et al. 2020b). Ces cellules se caractérisent par la production du granzyme, de la perforine, de facteur TNF, l'IL-10, IFN- γ et le GM-CSF et l'expression des récepteurs CD56, CD16, CD49b, NKp30, NKp44, NKp46, NKG2C/CD94 et NKG2D/CD94. De plus, les cellules NK sont dépourvues de CD127, du marqueur de lymphocytes T commun, CD3, et du récepteur des lymphocytes T (TCR) (Krzewski et Coligan 2012; Mandal et Viswanathan 2015; Paul et Lal 2017; Nagasawa, Spits, et Ros 2018b).

1.2.4.1.2. ILC1s

Les ILC1s se trouvent dans tous les tissus, mais plus abondants dans le foie, l'utérus, la peau, les glandes salivaires et l'intestin (Jiao et al. 2016). Elles nécessitent le facteur de transcription T-bet (Bank et al. 2020c).

Les ILC1s expriment CD127 (sous-unité α de récepteur d'IL-7, IL-7R α) et dépendent de cytokines IL-7 et IL-15 pour leur développement et leur survie (Bank et al. 2020c) (M. Zheng et Zhu 2022a). Elles expriment aussi le CD49a, le ligand induisant l'apoptose lié au TNF (TRAIL, *related apoptosis-inducing ligand*) et le CD103, et manquent de CD49b (Nagasawa, Spits, et Ros 2018a; M. Zheng et Zhu 2022b).

1.2.4.2. ILCs du groupe 2

Les ILCs du groupe 2 sont des cellules présentes dans divers tissus du corps, y compris les poumon, l'intestin grêle, le tissu adipeux, la moelle osseuse, la rate, le foie, les reins, le cerveau, amygdales, le cœur, l'estomac, le foie, la peau, les glandes salivaires, le pancréas, l'utérus et le sang périphérique (Kiniwa et Moro 2021; Spits et Mjösberg 2022; Naito et Kumanogoh 2023a). Elles sont identifiées par la présence de CD127, CD25, CD161, et de la molécule homologue du récepteur chemoattractant exprimées sur TH2 (CRTH2, *chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2*) « le récepteur de la prostaglandine D2 » (Nagasawa, Spits, et Ros 2018b; Spits et Mjösberg 2022).

Les ILC2s nécessitent pour leur développement le facteur de transcription GATA3 et le récepteur orphelin lié à RAR (RoR α , RAR-related orphan receptor), et libèrent diverses cytokines, telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-9, l'IL-10, l'IL-13, le facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF, *Granulocyte macrophage-colony stimulating factor*) et l'amphiréguline (AREG, *Amphiregulin*), en réponse à des facteurs environnementaux, notamment les cytokines, les neuropeptides, les médiateurs lipidiques, les hormones et les nutriments (Robinette et al. 2017; Zeng et al. 2019a; Naito et Kumanogoh 2023b).

Les ILC2s divisent en deux groupes : les ILC2s dites inflammatoires (ou iILC2) et les ILC2 naturelles (nILC2), qui sont sensibles à IL-25 et IL-33 respectivement. Les iILC2 peuvent synthétiser l'IL-17 (Cypowyj et Vivier 2016).

1.2.4.3. ILCs du groupe 3

Les ILCs du groupe 3 se situent dans les tissus du corps, en particulier dans les sites muqueux, la peau, les poumons, et l'intestin. Les ILC3s constituent la sous-population la plus prédominante chez la souris et dans l'intestin humain (Robinette et al. 2017; M. Li et al. 2023).

Les ILCs du groupe 3 dépendent du facteur de transcription ROR γ t et expriment l'AHR. Cela leur permet de produire des cytokines de type Th17 et Th22, qui sont IL-22, IL-17, et un facteur de stimulation des colonies de macrophages granulocytaires (GM-CSF) sous la stimulation de l'IL-23 et/ou de l'IL-1 β (Zeng et al. 2019b). Il a été démontré que l'AHR est indispensable au développement des cellules LTi fœtales, mais semble jouer un rôle dans la différenciation et le maintien des ILC3 après la naissance (Montaldo, Juelke, et Romagnani 2015).

Les ILCs du groupe 3 est un groupe hétérogène qui comprend CCR6+ ILC3 (qui sont les cellules LTi) et CCR6- ILC3 qui sont divisées en deux sous-groupes, en fonction de

l'expression de NCR (M. Li et al. 2023). Le premier sous-ensemble d'ILC3 à être décrit était celui des cellules inductrices du tissu lymphoïde (LTi), identifiées au début des années 1990 (Montaldo, Juelke, et Romagnani 2015; Konya et Mjösberg 2015). Les cellules LTi expriment CD117, CD45, CCR6, et CD127, et produisent la lymphotoxine (LT α β 1) et le TNF (Strober 2010; Zeng et al. 2019a).

Les NCR- ILC3s ne représentent qu'environ 15 % de l'ILC3s intestinales et expriment principalement l'IL-17 et moins de l'IL-22, tandis que les NCR + ILC3 (Nkp46 chez la souris et Nkp44 chez l'homme) représentent environ 70% de l'ILC3s intestinales et expriment principalement l'IL-22 et moins l'IL-17 (Cypowyj et Vivier 2016; Valle-Noguera et al. 2021; Y. Li et al. 2021).

1.2.4.4. ILCreg

Des cellules appelées « cellules lymphoïdes innées régulatrices (les ILCregs, *Regulatory innate lymphoid cells*) » ont été découverts récemment. Ces cellules présentent des similitudes avec les Tregs, telles que leur capacité à produire de l'IL-10 et du facteur de croissance transformant (TGF- β , *transforming growth factor*) (Thomas et Peebles 2022; Ma et al. 2023). Elles n'expriment ni CD4 ni FoxP3 (*forkhead box P3*), le marqueur signature des cellules Treg (Zeng et al. 2018). Les ILCregs proviennent prétendument de CHILP, et non de précurseurs ILC, et exprimeraient les facteurs de transcription ID3 et le facteur de transcription contenant la boîte SRY (*Sox4, SRY-box containing transcription factor*) (De Salvo, Buela, et Pizarro 2020).

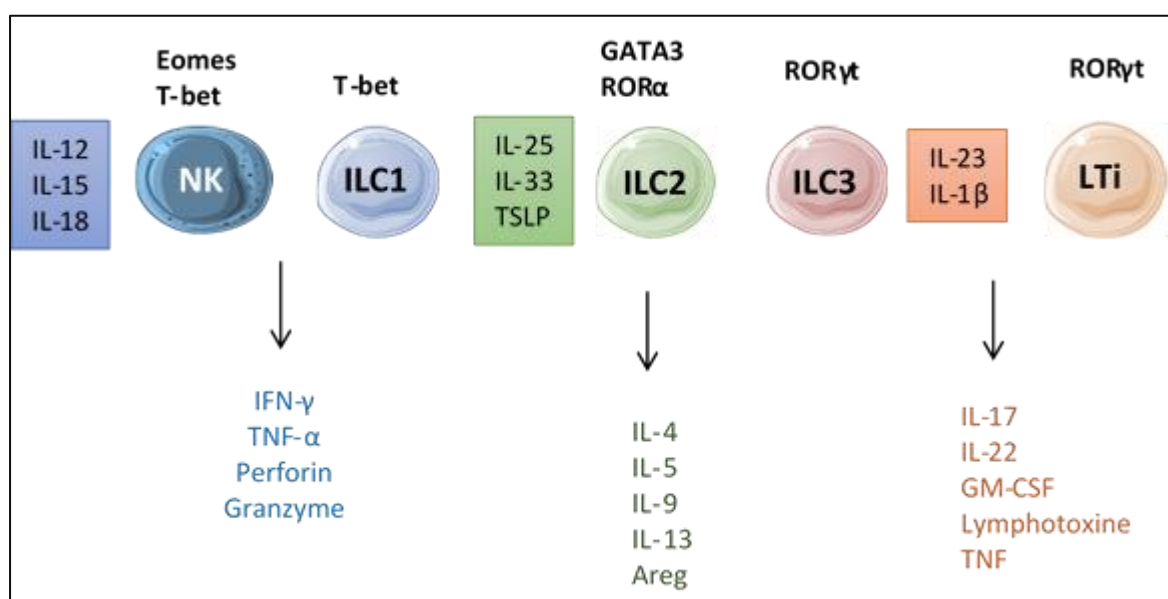


Figure 1.4. Sous types des cellules lymphoïdes innées (ILCs) (Shen et al. 2018; Vivier et al. 2018; Shi et al. 2022). Les ILCs du groupe 1 comprennent à la fois les cellules NK dépendantes d'Eomes et T-bet et les ILC1 dépendantes de T-bet. Ils pourraient, en réponse à la stimulation par l'IL-12, l'IL-15 et l'IL-18 produire d'IFN- γ et du TNF- α (les ILC) et granzymes et de la perforine (les NK). Les ILC2 dépendantes de GATA3 et de ROR- α ainsi que répondantes aux cytokines IL-25, IL-33 et TSLP, peuvent libérer des cytokines

: IL-4, IL-5, IL-9 et IL-13 et amphiréguline. Les ILC du groupe 3 englobent à la fois les cellules LT α i et les ILC3 dépendantes de ROR γ , et ils peuvent produire de l'IL-22, de l'IL-17 et du GM-CSF, principalement en réponse à l'IL-1 β et à l'IL-23. GM-CSF, Facteur de stimulation des colonies de macrophages granulocytes ; IL, Interleukine ; IFN, Interféron, TNF, Facteur de nécrose tumorale ; TSLP, Lymphopoïétine du stroma thymique ; Areg, l'amphiréguline.

1.2.4. Plasticité

Le terme plasticité a été introduit pour la première fois en 1985 par Helen Blau pour définir la capacité d'une cellule à changer d'identité (Pelletier et Stockmann 2022). Plusieurs études ont montré que les sous-ensembles ILC ont la capacité de plasticité, peuvent changer leurs phénotypes et leurs capacités fonctionnelles en fonction d'indices environnementaux locaux (figure 1.5) (Guia et Narni-Mancinelli 2020; Cobb et Verneris 2021).

Dans l'intestin de la souris, il a été rapporté que la transition des ILC3s produisant de l'IL-22 vers des ILC1s produisant de l'IFN- γ se fait grâce à la régulation négative de ROR γ t et la régulation positive de T-bet, induite par l'IL-12, IL-15 et IL-18 (Bal, Golebski, et Spits 2020; Korchagina et al. 2023). Il a été démontré pour la première fois en 2010, que les ILC3s humaines font varier leur profil de cytokines selon la manière dont elles sont stimulées (Leupold et Wirtz 2022). Les ILC3s stimulées par l'IL-12, se différencient réversiblement en ILC1s, dans laquelle en présence d'IL-2, d'IL-23, et d'IL-1 β Les ILC1s productrices d'IFN- γ sont capables d'exprimer ROR γ t et de se différencier en ILC3s producteurs d'IL-22 (Shao et al. 2021; Leupold et Wirtz 2022). Dans l'intestin, où les ILC3s constituent la principale population d'ILC à l'état d'équilibre, une inflammation chronique peut conduire à la transition des ILC3s en ILC1s, Ainsi une inflammation aiguë entraîne la transdifférenciation rapide des ILC3s en ILC1s, et ces ILC1s se reconvertissent en ILC3s après résolution de l'inflammation (Bal, Golebski, et Spits 2020).

La conversion d'ILC2s en ILC1s est médiée par la combinaison d'IL-12 et l'IL-1 β mais également l'IL-18 et l'IL-12, ce qui entraîne à une régulation négative de GATA3 et à une régulation positive de T-bet. À l'inverse, l'induction par l'IL-4 conduit à la conversion inversée des ILC1s en ILC2s (Pelletier et Stockmann 2022; Korchagina, Koroleva, et Tumanov 2023).

Le TGF- β , l'IL-1 β , l'IL-23 favorisent la conversion des ILC2s en ILC3 exprimant ROR γ t et en régulant négativement GATA-3 dans ces cellules (Heinrich et Korangy 2022). En induisant l'expression de GATA3, L'IL-4 favorise également la plasticité inversée des ILC3s en ILC2s (Korchagina, Koroleva, et Tumanov 2023).

Cette plasticité permet aux ILCs de s'adapter aux conditions locales changeantes, dans laquelle lors des changements du microenvironnement induites par des agents

pathogènes, leur plasticité permet une réponse rapide (Bal, Golebski, et Spits 2020; Korchagina, Koroleva, et Tumanov 2023).

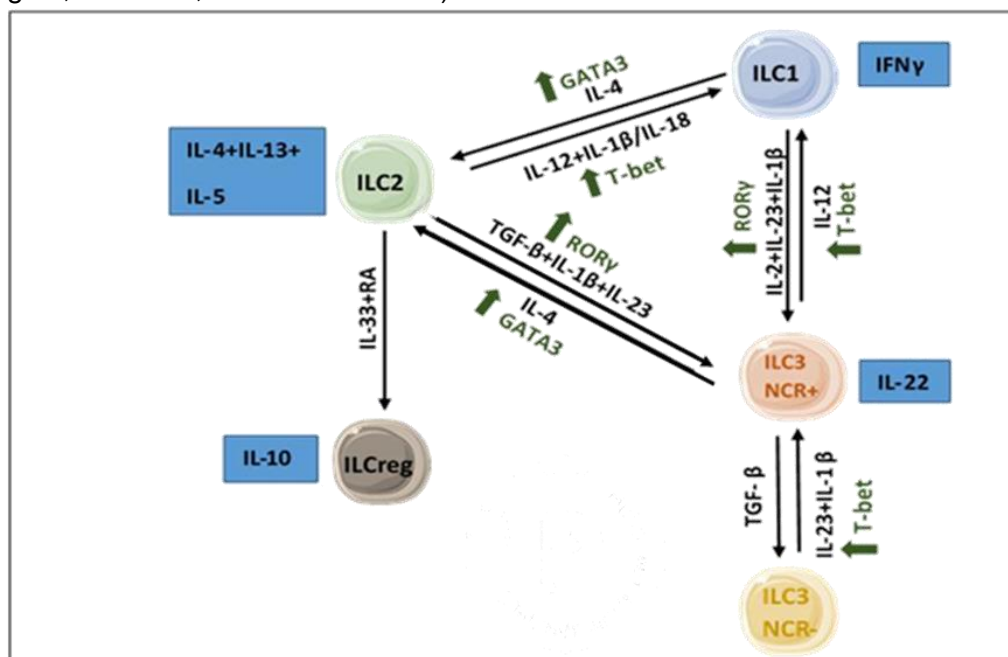


Figure 1.5. Plasticité des ILCs (Almeida et Belz 2016a; Orimo et al. 2020). ILC, cellule lymphoïde innée ; IL, interleukine ; TGF-β, facteur de croissance transformant-β ; ILCreg, cellule lymphoïde innée régulatrice ; IFN, interféron ; T-bet, T-box-exprimée dans les cellules T ; ROR γt, le récepteur orphelin lié au récepteur de l'acide rétinoïque - γt ; GATA3, protéine de liaison GATA 3 ; RA, acide rétinoïque.

1.2.5. Rôle des ILCs

Les ILCs ont été traditionnellement définies comme des cellules immunitaires capables de donner des réponses rapides en l'absence de sensibilisation préalable (X. Wang, Peng, et Tian 2019; Ryu et al. 2023). Les ILCs se trouvent dans différents tissus mais notamment dans les barrières muqueuses de l'intestin, de la peau et des poumons où elles agissent comme des cellules sentinelles qui répondent rapidement aux différents stimuli environnementaux pour initier des réponses immunitaires appropriées avant le lancement d'une réponse adaptative (Zhou et al. 2020; Yu, Jacquelot, et Belz 2022; Jan-Abu, Kabil, et McNagny 2023). Il est désormais clair que tous les sous-ensembles d'ILCs participent avec un rôle très important dans les réponses immunitaires innées aux virus, bactéries, champignons et parasites à ces surfaces barrières (Artis et Spits 2015).

En plus, les ILCs jouent des rôles importants dans l'homéostasie et la réparation des tissus (Hsu et al. 2021). Elles sont d'importants médiateurs entre le système immunitaire adaptatif et le microbiote (Beck, Ohno, et Satoh-Takayama 2020).

1.2.5.1. Rôle des ILCs du groupe 1

Les cellules NK et ILC1s contribuent à la réponse immunitaire contre les tumeurs et les agents pathogènes intracellulaires (les bactéries telles que, *salmonella spp*, certains virus comme le virus de la grippe et les parasites comme *Toxoplasma gondii*), en produisant notamment le TNF et l'IFN- γ après stimulation par l'IL-12, l'IL-15 ou l'IL-18. Ces cytokines ont des rôles essentiels, dans laquelle le TNF est cytotoxique pour les cellules infectées et les cellules tumorales et l'IFN γ est capable d'induire l'activation des cellules immunitaires telles que : les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques, afin d'améliorer leurs fonctions effectrices spécifiques telles que la phagocytose, la présentation de l'antigène, et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, Reactive oxygen species) (Mortha et Burrows 2018; Beck, Ohno, et Satoh-Takayama 2020b; Kumar et al. 2021; Poniewierska-Baran, Tokarz-Deptuła, et Deptuła 2021; Shin et McNagny 2021; Korchagina, Koroleva, et Tumanov 2021; M. Zheng et Zhu 2022a).

Les cellules NK peuvent éliminer les cellules cibles par la libération de granules contenant des granzymes et de la perforine ainsi par la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC, *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) (Favaro et al. 2022).

Les ILC1s sont souvent non cytotoxiques ou faiblement cytotoxiques (Jia, Wan, et Zhang 2023). Il a été découvert que les ILC1s hépatiques ont la capacité d'avoir une puissante activité cytolytique grâce aux granzymes fortement exprimées dans ces cellules par rapport aux cellules NK hépatique, ce qui souligne leur grande capacité à éliminer les cellules infectées par un virus ou les cellules tumorales (the Immunological Genome Consortium et al. 2015; Taggenbrock et Van Gisbergen 2023b). Enfin, Les ILC1s ont également un rôle essentiel dans la production du mucus par les cellules épithéliales, et donc elles participent à la protection des barrières intestinales contre les infections par les bactéries (Klose et al. 2013; Crinier et al. 2017a).

1.2.5.2. ILC du groupe 2

Les ILC2s jouent un rôle essentiel notamment dans les réponses immunitaires aux infections par les helminthes, telles que *Nippostrongylus brasiliensis*, et également participent à l'inflammation allergique des voies respiratoires (Y. Huang et al. 2015). Ces cellules produisent l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-13 qui induisent la contraction des muscles lisses et la production de mucus et contrôlent l'activation des granulocytes et des macrophages en favorisant leur polarisation en M2 pour participer au contrôle des infections parasitaires (N. Elemam, Hannawi, et Maghazachi 2017; Vivier et al. 2018). Ainsi, l'IL-13 secrété par les ILC2s favorise la migration des cellules dendritiques (DC, *Dendritic cell*) dans les ganglions lymphatiques drainants, ce qui permet la différenciation des cellules T naïves en cellules Th2

(Naito et Kumanogoh 2023). On outre, il a été décrit que les ILC2s peuvent améliorer la production d'IgE à partir des cellules B. Ces anticorps permettent l'activation des mastocytes et des basophiles aux cours des réactions allergiques (Symowski et Voehringer 2017; H. Zheng et al. 2021).

Les ILC2s peuvent libérer l'amphiréguline (Areg) et l'IL-9 qui jouent un rôle dans le processus de cicatrisation des plaies en favorisant la réparation des tissus pendant les périodes post-infection (Almeida et Belz 2016b; Y. Li et al. 2021). Des études ont montré qu'une stimulation des ILC2s par l'IL-25 lors d'une infection par la levure *Candida albicans* conduit à la production de l'IL-17 et l'expression de peptides antimicrobiens qui possèdent une activité antifongique directe contre *C. albicans* (Huang et al. 2015; Crinier et al. 2017a; Seo, Giles, et Kronenberg 2020). Enfin, les ILC2s peuvent participer à la régulation des réponses inflammatoires et immunitaires par la production l'IL-33 dans l'asthme, l'inflammation allergique des poumons et la dermatite allergique (Ma et al. 2023).

1.2.5.3. ILCs du groupe 3

Les ILCs du groupe 3 ont été considéré comme le type de cellule le plus impliqué dans l'élimination des infections bactériennes (Beck, Ohno, et Satoh-Takayama 2020). Ces cellules agissent contre les bactéries via l'IL-22 et l'IL-17 (Ma et al. 2023) qui favorisent le recrutement des neutrophiles et la libération de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales ce qui permet une inhibition ou une lyse des bactéries à proximité de la surface épithéliale (Almeida et Belz 2016b; Crinier et al. 2017b).

Les cellules LTi produisent l'IL-22, l'IL-17A et de l'IL-17F suite à l'expression de ROR γ t et sont essentielles à la formation des tissus lymphoïdes secondaires au cours de l'embryogenèse. Chez l'adulte les cellules LTi contribuent à la formation de follicules lymphoïdes isolés (ILFs, isolated lymphoid follicles) riches en cellules B (Pantazi et Powell 2019; Panda et Colonna 2019). De plus, elles se caractérisent également par un forte du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH, *Major histocompatibility complex*) de classe II, afin de présenter des antigènes dérivés du microbiote aux cellules T CD4+ et donc influencer les réponses immunitaires spécifiques contre les bactéries (Seo, Giles, et Kronenberg 2020b). Après la naissance, Les cellules LTi peuvent produire de l'IL-17A et de l'IL-22 pour protéger le tractus gastro-intestinal contre les agents pathogènes (Zeng et al. 2019).

1.2.5.4. ILCregs

Les ILCregs jouent un rôle inhibiteur dans la réponse immunitaire innée en favorisant la résolution de l'inflammation intestinale (S. Wang et al. 2017).

1.3. Interféron-gamma

1.3.1. Généralités

Les interférons (IFN) sont de puissantes cytokines multifonctionnelles sécrétées par plusieurs types cellulaires (Kim et Shin 2021). Le terme « interférons » vient de la description des molécules qui protègent les cellules en « interférant » avec l'infection virale. C'est en 1957 que les scientifiques Isaacs et Lindenmann ont découvert que les cellules infectées par un virus de *la grippe A* (IAV, *Influenza A virus*) fabriquent un agent soluble capable d'empêcher la croissance virale (Dianzani 1975; Castro et al. 2018a; Mertowska et al. 2023a).

Les IFNs sont divisés en trois types différents : IFN de types I, IFN de type II et IFN de type III (Taylor 2014). La famille des IFN de type I comprend 13 sous-types d'IFN-alpha (IFN- α) chez l'homme (14 chez la souris), un seul IFN-béta (IFN- β) et d'autres produits mal définis (IFN ϵ , IFN τ , IFN κ , IFN ω , IFN δ et IFN ζ), l'IFN- δ et l'IFN- τ . Ces derniers ont été décrits uniquement chez les porcs et les bovins, et n'ont pas d'homologues humains. En revanche, il n'existe qu'un seul IFN de type II qui est l'IFN- γ , tandis que la famille des IFN de type III comprend l'IFN-lambda1 (IFN- λ 1), l'IFN λ 2 et l'IFN λ 3 et l'IFN λ 4 récemment identifié (Platanias 2005; McNab et al. 2015).

1.3.2. Structure d'IFN- γ et localisation de son gène *IFNG*

Le gène *IFNG* qui code la protéine IFN- γ se situe sur le chromosome 12q15 (figure 1.6). Sa taille est environ 5,4 kb et il se compose de 4 exons et de trois régions intermédiaires (Bhat et al. 2018a; Jorgovanovic et al. 2020a).

L'IFN- γ est un homodimère de 50 kDa formé par l'association de deux monomères "deux sous-unités polypeptidiques" de manière antiparallèle, contenant chacun six hélices alpha qui représentent 62 % de la structure et qui ont une longueur de 9 à 21 résidus, et d'une région C-terminale étendue (Ealick et al. 1991; Thiel et al. 2000; Castro et al. 2018b). Cette protéine est composée de 143 acides aminés et est glycosylée aux extrémités amino. Il a été rapporté que la glycosylation elle-même ne soit pas essentielle à l'activité biologique d'IFN- γ , mais empêche plutôt sa dégradation par les protéinases. Cette modification chimique augmente la demi-vie des interférons dans le sang et prolonge les effets médiés par l'IFN- γ (Popko et al. 1997; Jorgovanovic et al. 2020b).

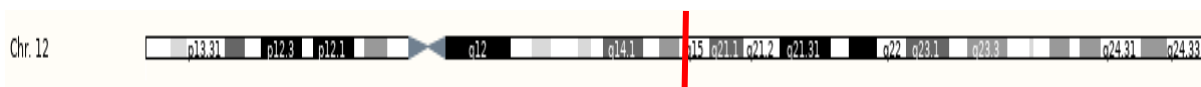


Figure 1.6. Localisation du gène *IFNG* sur le chromosome 12 humaine (D'après NCBI).

1.3.3. Récepteurs d'IFN- γ

Le complexe récepteur de l'IFN- γ est constitué de deux chaînes alpha qui sont les chaînes de liaison au ligand (IFN- γ R1) également appelé CD119, et la chaîne bêta qui est la chaîne accessoire (IFN- γ R2) (Pestka et *al.* 1997; Tau et Rothman 1999). IFN- γ R2 augmente l'affinité de l'IFN- γ R1 pour son ligand, en améliorant la stabilité de complexe (Tau et Rothman 1999). L'IFNGR1 et IFNGR2 sont localisés respectivement sur les chromosomes 6 et 21 et leur expression est différente. L'IFN- γ R1 est exprimé de manière constitutive à des niveaux modérés à la surface de presque toutes les cellules, en revanche l'IFN γ R2 est exprimé de manière constitutive à de faibles niveaux (Castro et *al.* 2018c).

1.3.4. Signalisation d'IFN

Les deux chaînes IFN- γ R1 et IFN- γ R2 sont constitutivement associées à deux kinases, janus kinase (JAK1) et JAK2 respectivement, au niveau de leur domaine intracellulaire (Altare et Casanova 2001). Lors de la fixation de l'IFN- γ sur IFNGR, il y aura rapprochement des deux chaînes du récepteur conduisant à la phosphorylation de JAK1 et JAK2. Les JAK ainsi activés phosphorylent le domaine intracellulaire du récepteur (tyrosine 440 sur l'IFN γ R1 humain), en créant des sites de liaison pour le transducteur de signal et activateur de transcription 1 (STAT1, *Signal transducer and activator of transcription 1*) (Altare et Casanova 2001; Castro et *al.* 2018c). Cette fixation entraîne la phosphorylation de la molécule STAT1 (à l'extrémité C-terminale des résidus tyrosine Y701) par JAK, ce qui entraîne la formation de complexes homodimères STAT1 connus sous le nom de facteur activé par l'interféron γ (GAF, *gamma-activated factor*). Ces complexes se déplacent vers le noyau et agissent comme des facteurs de transcription liés aux éléments de la séquence activée par l'interféron γ (GAS) dans les promoteurs des gènes stimulés par l'interféron « gène stimulé par interféron (ISG, *Interferon-stimulated gene*) » qui sont à la fois des régulateurs positifs et négatifs de la signalisation inflammatoire (figure 1.7) (Mojic, Takeda, et Hayakawa 2017; Castro et *al.* 2018a; Jorgovanovic et *al.* 2020b).

De nombreux gènes régulés par l'IFN- γ sont en fait des facteurs de transcription qui déterminent davantage la transcription des gènes effecteurs notamment « le facteur

régulateur de l'interféron 1 (IRF1, *Interferon regulatory factor 1*), IRF2, IRF8, IRF9, RELA, JUN et autres », et leur activation permet l'expression de plusieurs gènes impliqués dans des processus biologiques tels que la réponse inflammatoire, l'apoptose, la prolifération et la différenciation cellulaire, l'hématopoïèse et la suppression des tumeurs..ect (Schroder et al. 2004; Bhat et al. 2018a; Jorgovanovic et al. 2020b).

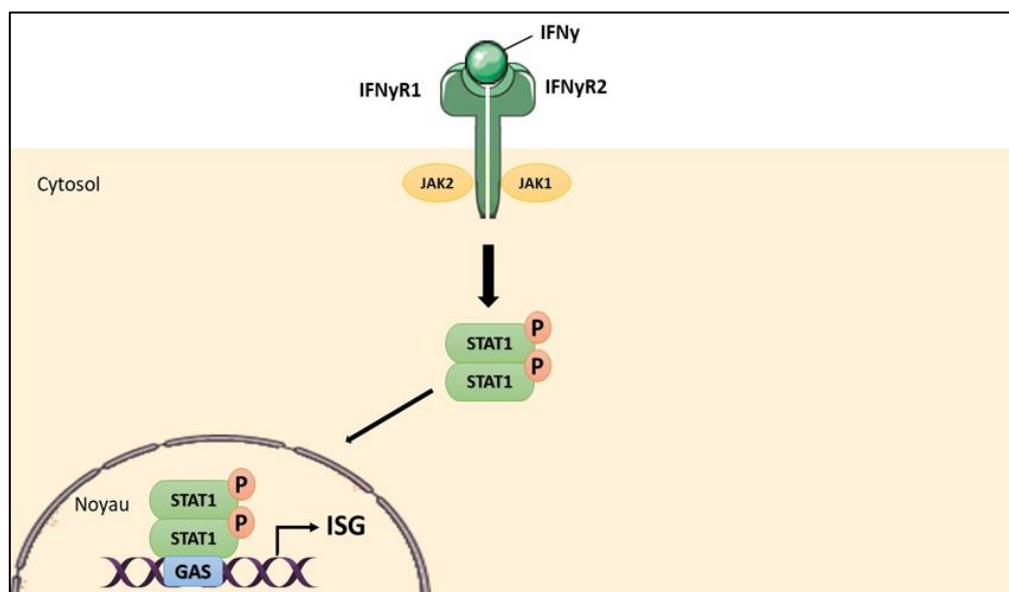


Figure 1.7. Signalisation d'IFN γ (Ivashkiv 2018). La synthèse d'IFN- γ peut être induite par des cytokines (comme IL-12 et IL-18) ou suite à l'activation des récepteurs. L'IFN- γ agit sur son récepteur pour induire une signalisation rapide et transitoire de la Janus kinase (JAK) – transducteur de signal et activateur de transcription (STAT) et l'induction du gène stimulé par l'interféron (ISG). Les ISG codent pour de nombreux produits ayant des fonctions immunitaires effectrices directes, telles que les chimiokines, les molécules du CMH, les récepteurs phagocytaires et divers facteurs antiviraux et antibactériens. GAS, site d'activation de l'IFN- γ ; IFN- γ R, récepteur IFN- γ ; ISG, gène stimulé par l'interféron ; STAT1, le transducteur de signal et activateur de transcription 1 ; JAK, kinase janus kinase.

1.3.5. Rôle d'IFN- γ

L'IFN- γ joue un rôle important dans les réponses immunitaires innées et adaptatives, contre les infections bactériennes et virales, ainsi que dans la surveillance des tumeurs (Zaidi et Merlino 2011; Mertowska et al. 2023b). L'IFN- γ est principalement produit par les cellules Th1, les lymphocytes T CD8+, les lymphocytes B, les cellules T tueurs naturels (NKT, *Natural killer T*) et les cellules présentatrices d'antigènes (monocytes, macrophages, cellules dendritiques), après avoir été stimulées par des « interleukines produites *in-situ*, telles que l'IL-12, l'IL-15, l'IL-18, l'IL-21, des antigènes, des mitogènes, des modèles moléculaires associés aux dommages (DAMP, *Damage associated molecular patterns*) ou modèles moléculaires associés agents pathogènes (PAMP, *Pathogen associated molecular patterns* respectivement » (Bhat et al. 2018b; Jorgovanovic et al. 2020a). En revanche, la production

de l'IFN- λ est régulée négativement par l'IL-4, l'IL-10, le TGF- β et les glucocorticoïdes (Rožman et Švajger 2018; Bhat et al. 2018a).

Les ILC1s et NCR+ILC3 sont également des cellules productrices d'IFN- γ , dont sa production est amplifiée par les niveaux élevés d'expression de STAT4 induits par T-bet (Korchagina, Koroleva, et Tumanov 2021b). Les ILC1s produisent de l'IFN- γ en réponse à l'IL-12, l'IL-15, l'IL-18, tandis que les ILC3s produisent l'IFN- γ en réponse à l'IL-23 et à l'IL-1 β (Seo, Giles, et Kronenberg 2020c).

L'IFN- γ libéré par les cellules ILCs joue plusieurs rôles :

- Il permet le recrutement des macrophages et des neutrophiles, et stimule l'expression des chimiokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11 qui favorisent le recrutement des cellules T et d'autres ILC (Metzemaekers et al. 2018; Yuan et al. 2021).
- Il stimule la polarisation des macrophages M1 et améliore les activités effectrices, en favorisant la phagocytose et la production de ROS et d'oxyde nitrique (NO, *Nitric oxide*) (Korchagina, Koroleva, et Tumanov 2021b).
- Il induit la polarisation des cellules T naïves vers les réponses de type 1 (Th1) et améliore également l'activité cytotoxique des cellules T cytotoxiques (CTL, Cytotoxic T cell) (Whitmire, Tan, et Whitton 2005; Abdi et al. 2022).
- Il stimule la prolifération des cellules épithéliales (Korchagina, Koroleva, et Tumanov 2021b).
- Il améliore les réponses immunitaires antitumorales et peut inhiber la prolifération des cellules cancéreuses et l'angiogenèse, tout en favorisant l'apoptose (Van Beek et al. 2016).
- Il induit l'expression du CMH I et du CMH II pour favoriser la présentation de l'antigène (Korchagina, Koroleva, et Tumanov 2021b).
- Et enfin, il contrôle la libération de mucine par les cellules épithéliales, ce qui permet la formation d'un gel de mucine qui protège la barrière épithéliale (Klose et al. 2013; Crinier et al. 2017b).

1.4. Réaction en chaîne par polymérase

1.4.1. Définition

La réaction en chaîne par polymérase (PCR, *Polymerase chain reaction*) a été inventée par Kary Mullis en 1983, brevetée en 1985 et récompensée par le prix Nobel en 1994, et elle est devenue une technique indispensable pour de nombreuses applications dans la recherche scientifique et les enquêtes cliniques et médico-légales (Lo et Chan 2006a; Valones et al. 2009). Il s'agit d'une technique qui se base sur l'amplification enzymatique de séquences d'acides nucléiques (ADN modèle) pour générer des dizaines de milliards de

copies d'un fragment d'ADN spécifique, *via* des cycles répétés de dénaturation, d'hybridation des oligonucléotides et d'extension, grâce à l'ADN polymérase (Gibbs 1990; Kadri 2020b).

1.4.2. Principe de PCR

La PCR est une technique *in vitro* qui permet l'amplification, l'étude et l'analyse des gènes (ADN), leurs transcrits (ARN) et les protéines obtenues à partir de divers tissus. Chaque test nécessite la présence de ADN matrice, amorces, nucléotides et ADN polymérase (Maheaswari, Kshirsagar, et Lavanya 2016).

Grâce au processus de réplication en laboratoire utilisant la PCR, plusieurs copies et séquences spécifiques peuvent être obtenues à partir du fragment d'ADN extrait, qui peut être de l'ADN génomique, ou de l'ADN complémentaire obtenu par la réaction en chaîne par polymérase par transcription inverse (RT-PCR, *Reverse transcription polymerase chain reaction*) à partir d'extrait d'ARN poly-A (Kadri 2020a)..

La PCR repose sur trois étapes simples requises pour toute réaction de synthèse d'ADN : (1) dénaturation de la matrice en simple brin ; (2) recuit des amorces sur chaque brin d'origine pour la synthèse d'un nouveau brin ; et (3) extension des nouveaux brins d'ADN à partir des amorces (Delidow et al. 1993).

1.4.3. Les composants de la PCR

1.4.3.1. L'ADN matrice

L'ADN cible contient la séquence cible, et cet ADN peut être un échantillon d'ADN génomique isolé à partir de cellules ou de tissus, ou de l'ADN obtenu à partir d'échantillons d'ARN par voie inverse transcription (RT-PCR) (Ishmael et Stellato 2008; Green et Sambrook 2018; 2019a).

1.4.3.2. Les amorces

Les amorces sont de courts oligonucléotides (plus l'amorce est courte, plus l'hybridation avec la matrice est rapide), simple brin et complémentaires d'une séquence d'ADN choisie d'un gène d'intérêt, où une amorce reconnaît de manière complémentaire l'ADN brin 5'-3' d'intérêt (brin de sens) et l'autre devrait compléter le brin complémentaire (3'-5') d'ADN (anti-sens) (Ishmael et Stellato 2008; Lorenz 2012; Álvarez-Fernández 2013; Kadri 2020b). Les amorces sont paires et comprennent l'amorce directe et l'amorce inverse (Chuang, Cheng, et Yang 2013).

Le choix des amorces, est l'un des facteurs les plus importants affectant la qualité de la PCR. Par conséquent, plusieurs règles doivent être respectées lors de la conception d'amorces (Rychlik 2000). Ces règles comprennent :

- La longueur de l'amorce.
- La température de fusion (TM).
- La teneur en GC.
- L'extrémité 3' des amorces.

1.4.3.3. L'ADN polymérase

L'ADN polymérase est une enzyme qui synthétise des brins d'ADN complémentaires (Ishino et Ishino 2014). Cette enzyme lit un brin d'ADN matrice et ajoute des bases azotées libres 2' désoxynucléotide triphosphate (dNTP, *Nucleoside triphosphate*) à une amorce (Elkins 2015).

L'ADN polymérase Taq est l'une des premières ADN polymérases thermostables découvertes, et fréquemment utilisée pour la PCR (Bhadra et al. 2020). La Taq polymérase a été dérivée à partir de *Thermus Aquaticus*, dont l'habitat naturel est constitué de sources thermales chaudes, et donc n'est pas inactivée lors de l'étape de dénaturation d'ADN double brin à l'ADN simple brin (Van Pelt-Verkuil, Van Belkum, et Hays 2008; Ishino et Ishino 2014). Elle présente une activité 5'-exonucléase et n'a pas d'activité de relecture 3'-5' comme autres ADN polymérases thermostables telles que l'ADN polymérase *Pyrococcus furiosus* (Pfu) qui possèdent cette activité (Dymond 2013; Green et Sambrook 2019b). Un mélange de deux ADN polymérases thermostables différentes peut être utilisé, où la première l'ADN polymérase Taq, et la deuxième en quantités beaucoup plus faibles, fournit une fonction d'exonucléase de relecture 3' → 5' (Green et Sambrook 2019a).

1.4.3.4. Désoxynucléotide triphosphates

Les désoxynucléotides triphosphates (dNTP) sont « l'adénosine triphosphate (dATP), le cytidine triphosphate (dCTP), le guanosine triphosphate (dGTP) et le thymidine triphosphate (dTTP) », capturés par l'ADN polymérase et attachés à la partie terminale des amorces pour étendre la chaîne d'ADN (Dey 2018b).

1.4.3.5. Ions de Mg²⁺

Les ions magnésium possèdent deux fonctions dans la PCR : réagir avec les dNTP pour former des complexes qui sont les substrats de la Taq polymérase, et stabiliser les complexes amorce-modèle (Green et Sambrook 2019c).

1.4.3.6. Le thermocycleur

Un thermocycleur est un appareil qui contrôle la durée et la température de chaque cycle (Khehra, Padda, et Swift 2024a).

1.4.4. Étapes de la PCR

Il existe trois principales étapes dans une réaction PCR : la dénaturation, l'hybridation et l'extension (figure 1.8) (Canene-Adams 2013).

1.4.4.1. Dénaturation

La dénaturation est réalisée à 94 °C, pendant 30 secondes à 5 minutes. Elle permet la dissociation des liaisons hydrogène entre les paires de bases complémentaires de l'ADN double brin ce qui conduit à sa dissociation en ADN simple brin (Canene-Adams 2013; Khehra, Padda, et Swift 2024).

1.4.4.2. Hybridation

Les amorces d'ADN s'hybrident d'une manière spécifique à l'ADN simple brin en reformant des liaisons hydrogène, grâce à la complémentarité des bases sur un brin d'ADN, et cela se fait à une température dépendante de la composition en bases puriques et pyrimidiques de ces amorces (en général entre 45°C à 65°C) (Vassias 2012; Khehra, Padda, et Swift 2024).

1.4.4.3. Extension

La troisième étape est réalisée à une température de 72°C pendant 2 à 5 minutes (Joshi et Deshpande 2011a). La Taq polymérase se lie aux amorces d'ADN, et allonge les amorces en y incorporant des bases complémentaires (les désoxyribonucléoside triphosphates) de la séquence matrice, pour former deux nouveaux brins d'ADN, en utilisant les brins d'origine comme modèles (Joshi et Deshpande 2011; Vassias 2012; Kadri 2020b). Ce processus aboutit à la duplication de l'ADN d'origine. Chacune des nouvelles molécules contenant un ancien et un nouveau brin d'ADN (Joshi et Deshpande 2011b).

Le cycle entier est ensuite répété un nombre de fois prédéterminé (25 à 30 fois) pour augmenter la quantité d'ADN (Dey 2018). L'ensemble du processus peut être terminé en environ 2 à 3 heures (Lo et Chan 2006b).

Les produits d'amplification sont visualisés à l'aide du bromure d'éthidium sous illumination par des ultraviolets (UV) (Vassias 2012).

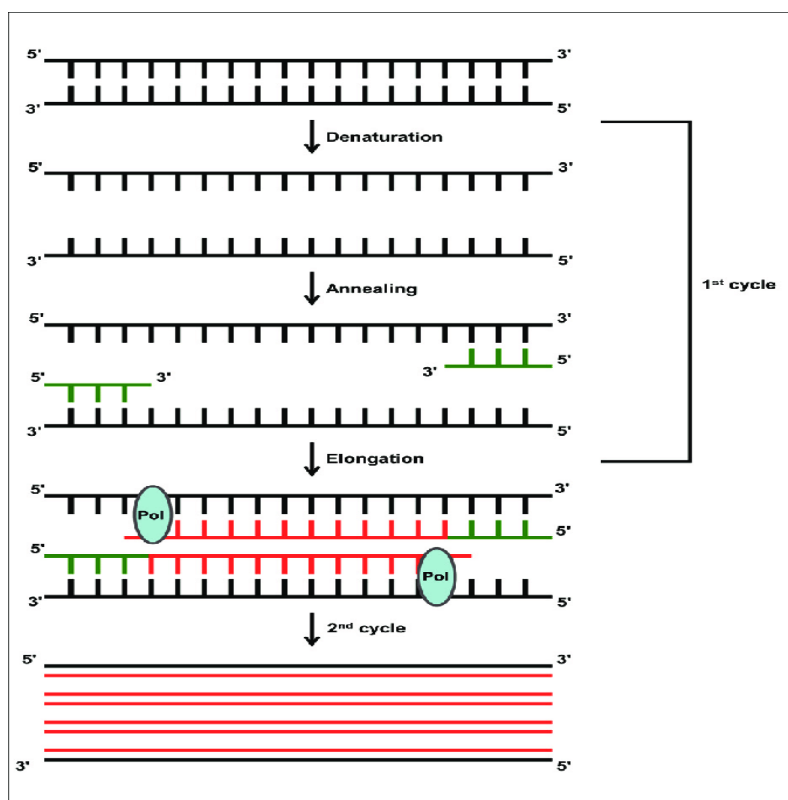


Figure 1.8. Étapes de la réaction en chaîne par polymérase (PCR) (Nestorov et al. 2013).

1.4.5. Avantages de la PCR

La PCR est une technologie facile à comprendre et à utiliser qui produit des résultats rapides (Garibyan et Avashia 2013). Elle permet aux chercheurs à cloner et séquencer des gènes, pour la détection de mutations pertinentes pour les maladies héréditaires, et la transformation maligne ou le typage tissulaire (H. Y. Liu et al. 2019). L'application la plus fréquente de la PCR concerne le diagnostic. Enfin, la PCR est devenue une modalité de détection d'agents microbiens, ne nécessitant qu'un petit échantillon pour l'analyse (Larzul 1989).

1.5. Problématique et objectif

1.5.1. Problématique

Les cellules lymphoïdes innées (ILC) constituent une famille de cellules immunitaires impliquées dans l'immunité innée. Ces cellules peuvent être classées sur la base des facteurs de transcription des cytokines qu'elles produisent en trois groupes (ILC du groupe 1 qui comprennent 'les ILC1s et les cellules NK', ILC du groupe 2 et ILC du groupe 3 qui comprennent 'les LTI, NCR- ILC3, et Les NCR+ ILC3'). Les ILCs se trouvent dans différents tissus et jouent un rôle de première ligne dans la défense de l'hôte et dans l'homéostasie des tissus en répondant rapidement aux différents facteurs environnementaux. Les ILC1s et ILC3s sont considérés comme des homologues innés des cellules Th1 et Th17/Th22 respectivement. Ces cellules sécrètent l'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-17 et de l'IL-22 qui contribuent à la défense immunitaire contre les agents pathogènes. Il a été montré que l'IFN- γ codé par *IFNG*, libéré par ces cellules est impliquée dans la défense de l'hôte contre les infections bactériennes, notamment celles provoquées par *P. aeruginosa*.

Dans ce travail, nous allons nous intéresser à l'étude de l'expression de l'IFN- γ par l'utilisation de la PCR, une des techniques de biologie moléculaire, dont sa réussite nécessite l'utilisation d'une bonne paire d'amorces conçue à l'aide de l'outil Primer-Blast.

1.5.2. Objectif

L'objectif de ce travail consiste à l'élaboration des séquences d'oligonucléotides qui serviront d'amorces pour amplifier l'exon 1 encadrant le gène *IFNG* par PCR.

1.5.3. But

Ce travail consiste à concevoir des amorces spécifiques au gène *IFNG* afin de déterminer son taux d'expression par les ILC1 et ILC3 au cours d'infection bactérienne par *P. aeruginosa*.

Chapitre 2. Matériel et méthodes

2.1. Conception d'amorces

Le choix des amorces appropriées est probablement le facteur le plus important affectant la réaction PCR. Lors de la conception d'amorces, il est important de définir la région souhaitée et de concevoir des amorces spécifiques de cette région d'intérêt (Ye et al. 2012; Elkins 2015a).

Des amorces PCR sont nécessaires pour copier l'ADN et encadrer la région d'ADN d'intérêt. L'ADN polymérase fait croître les deux amorces dans la direction 5'-3' (Elkins 2015b). Des amorces appropriées peuvent être conçues à l'aide des outils bioinformatiques. Ces outils aident à concevoir des amorces, mais une validation en laboratoire est en outre requise (Andreson, Kaplinski, et Remm 2015).

Les caractéristiques importantes à prendre en compte lors de la conception des amorces sont les suivantes :

- **La longueur de l'amorce**

Les amorces optimales doivent être d'une longueur de 18 à 35 bases nucléotidiques (Elkins 2015).

- **Température de fusion (TM)**

La température de fusion (TM) doit être comprise entre 55 et 72 °C, et les paires d'amorces doivent être conçues de manière à ce que leurs températures de fusion ne diffèrent pas de manière significative (c'est-à-dire ne dépasse pas 5 °C) (Van Pelt-Verkuil, Van Belkum, et Hays 2008; Chuang, Cheng, et Yang 2013; Elkins 2015).

- **La teneur en GC**

Le contenu optimal en GC doit être compris entre 40 à 60 % (Lorenz 2012).

- **L'extrémité 3' des amorces**

L'extrémité 3' des amorces doit contenir un G ou un C afin de serrer l'amorce, car les appariements de bases GC sont plus stables thermodynamiquement que les appariements de bases AT (Lorenz 2012; Chuang, Cheng, et Yang 2013). Les homooligomères (comme -AAAAA-) et les répétitions de dinucléotides (comme -CACACA-) doivent être évités, en particulier aux extrémités 3' des amorces (Rychlik 2000). Et enfin, les extrémités 3' d'un ensemble d'amorces 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, pour éviter la formation de dimères d'amorce et de structures de boucles en épingle à cheveux (Lorenz 2012).

- **La spécificité**

Pour éviter des résultats PCR invalides, la spécificité garantit que l'amorce conçue peut détecter une séquence spécifique (Chuang, Cheng, et Yang 2013). Il est à noter que le nombre de bases de l'amorce spécifique choisie doit être inférieur à 1000, et le nombre des produits aspécifiques doit être supérieur à 1000.

2.2. Conception des amorces pour le gène *IFNG*

2.2.1. Recherche de la séquence du gène *IFNG*

La conception des amorces encadrant le gène *IFNG* débute par la recherche de sa séquence de référence à partir de la base de données « Ensembl » « www.ensembl.org », qui a été lancée en 2000 et s'agit d'une source fournie un cadre bioinformatique pour organiser la biologie autour des séquences de grands génomes (Hubbard 2002; Kinsella et al. 2011) (Figure 2.1, 2.2 et 2.3).

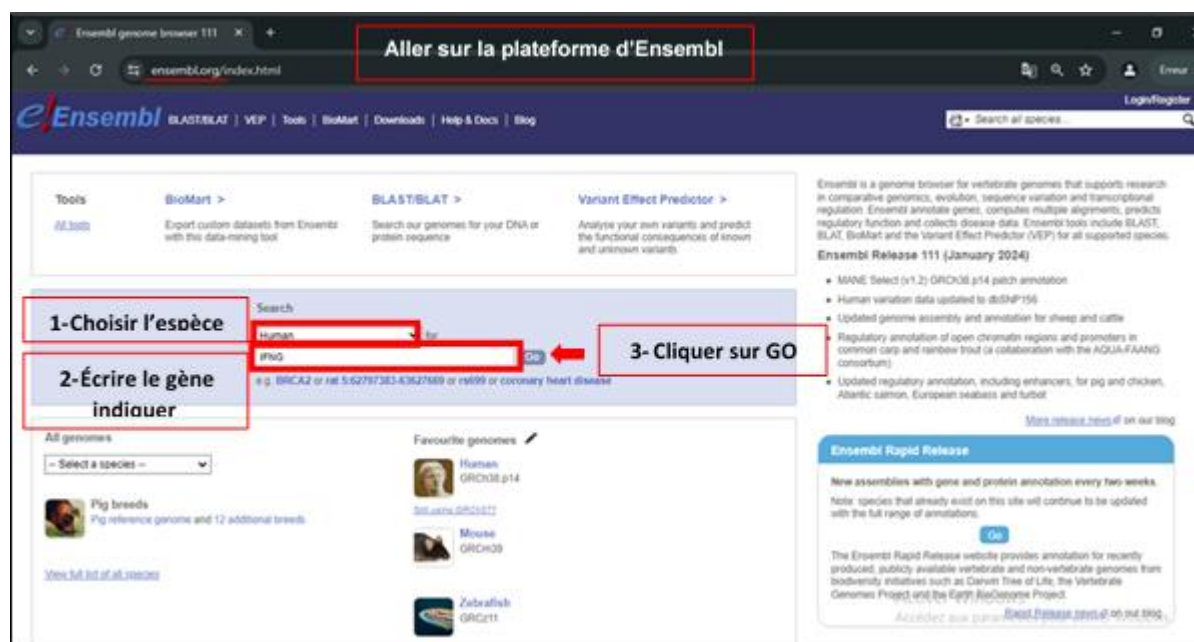


Figure 2.1 Plateforme de la base de données Ensembl. (1) Spécifier l'espèce humaine. (2) inscrire le nom du gène *IFNG*. (3) Cliquer sur GO pour afficher les résultats (encadrer en rouge).

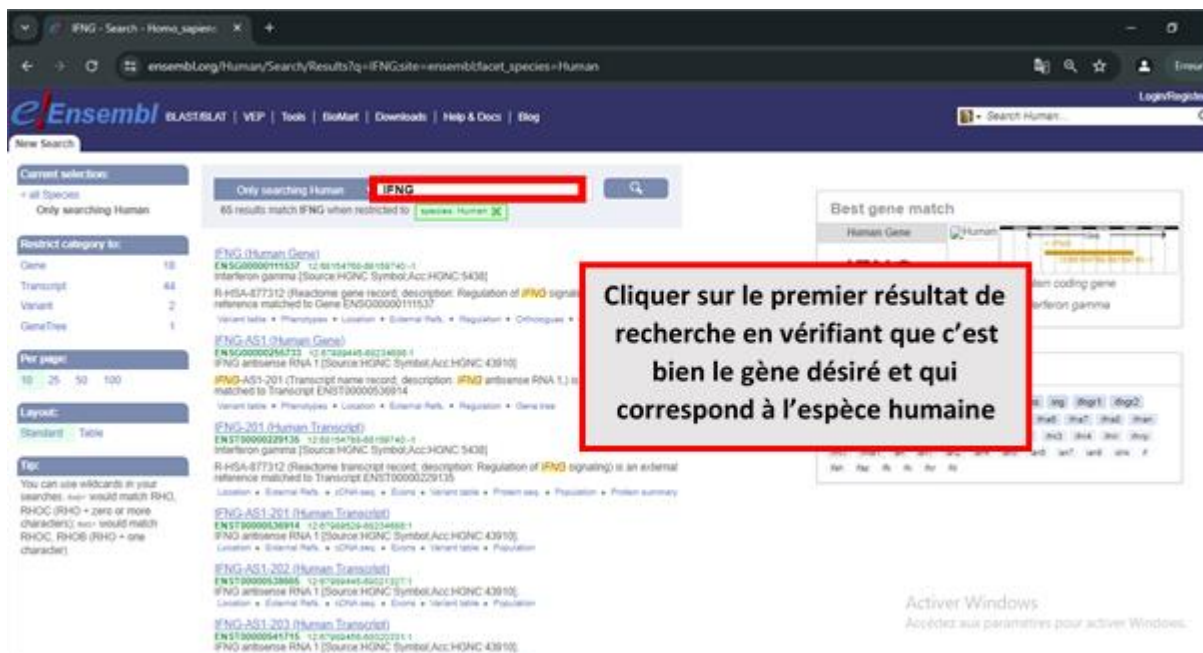


Figure 2.2. Résultats de la recherche du gène *IFNG*. Cliquer sur le premier résultat de recherche en vérifiant que c'est bien le gène désiré et qui correspond à l'espèce humaine (encadrant en rouge).

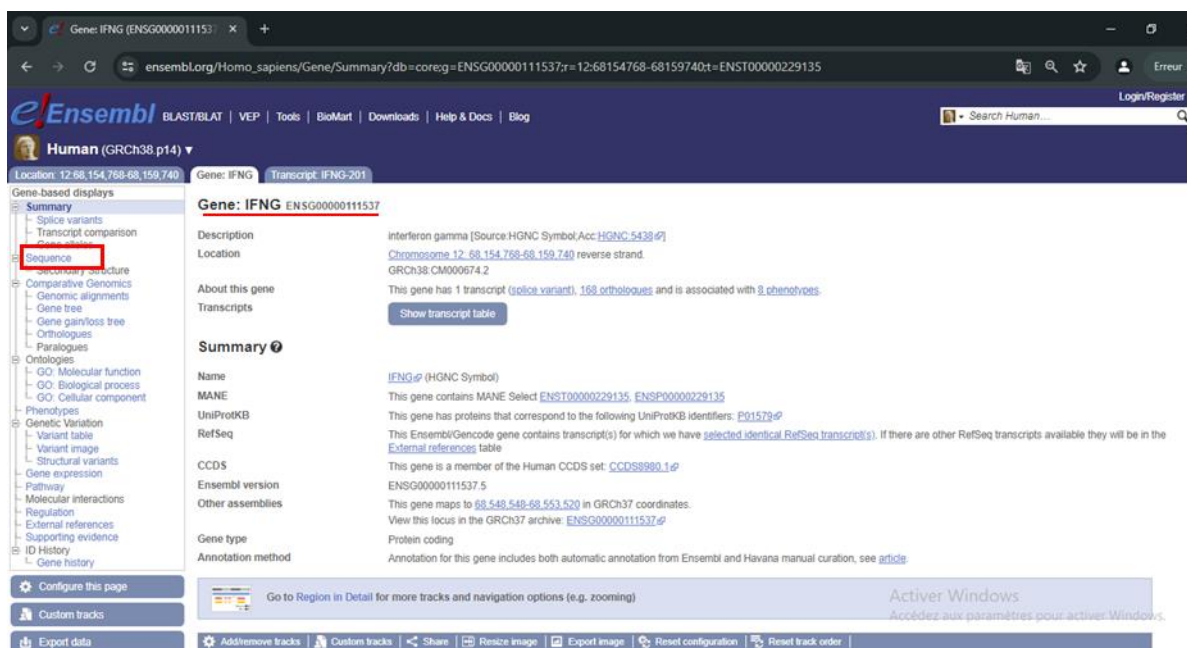


Figure 2.3. Caractéristiques du gène *IFNG*. La plateforme de la base de données montre les différentes caractéristiques du gène *IFNG*, ensuite il faut cliquer sur « Séquence » pour afficher la séquence du gène (encadrer en rouge).

La séquence du gène *IFNG* est présentée dans la figure 2.4.

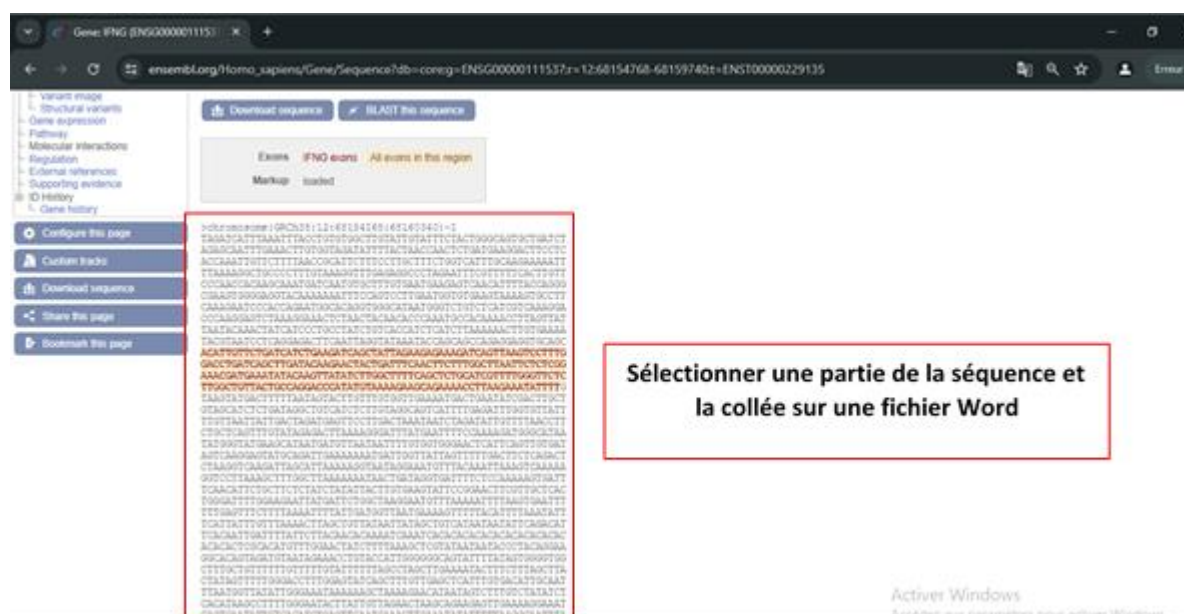


Figure 2.4. La séquence du gène *IFNG* depuis la plateforme « Ensembl ». Il faut sélectionner une partie de la séquence et la copier sur un document Word. Les séquences codantes (Exons) sont représentées en rouge, et les séquences non codantes (Introns) sont représentées en noir.

Pour faciliter la recherche des amorces, 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).

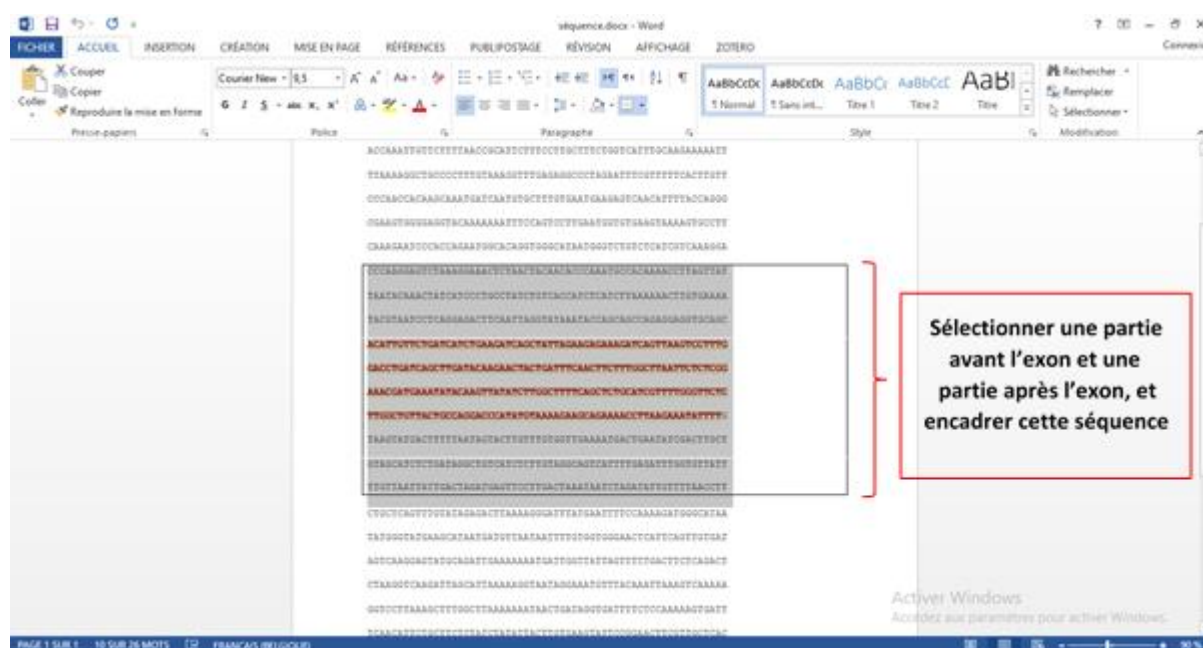


Figure 2.5. La séquence d'intérêt.

2.2.2. Le design des Primers : Outil Primer-BLAST

Pour la conception des amorces spécifiques du gène *IFNG*. On utilise l'outil Primer-BLAST qui permet aux utilisateurs de concevoir de nouvelles amorces spécifiques à une cible en une seule étape ainsi que de vérifier la spécificité des amorces préexistantes. Cet outil est accessible au public sur National Center for Biotechnology Information (NCBI)

Chapitre 2. Matériel et méthodes

« <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> », créé en 1988 pour faciliter l'utilisation de bases de données et pour développer des systèmes d'information pour la biologie moléculaire (Sayers et al. 2012; Ye et al. 2012; Wojtkiewicz, Wiederin, et Ciborowski 2016). Les figures 2.6, 2.7 et 2.8 représentent les étapes à suivre pour l'utilisation de cet outil.



Figure 2.6. Plateforme de la base de données NCBI.

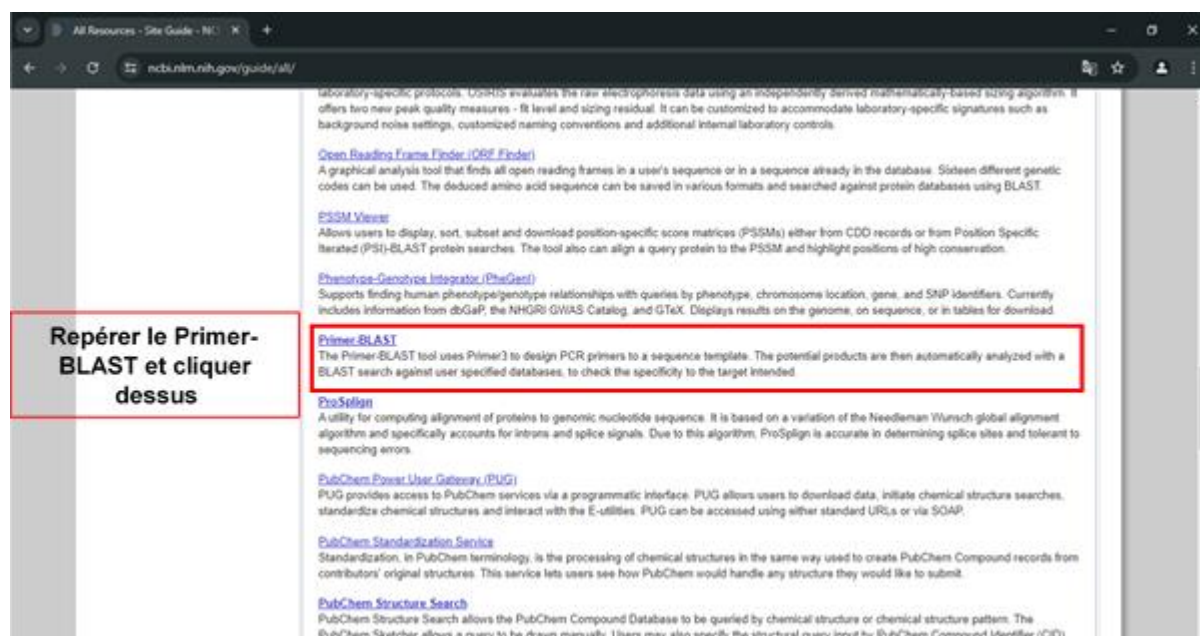


Figure 2.7. L'outil Primer-Blast.

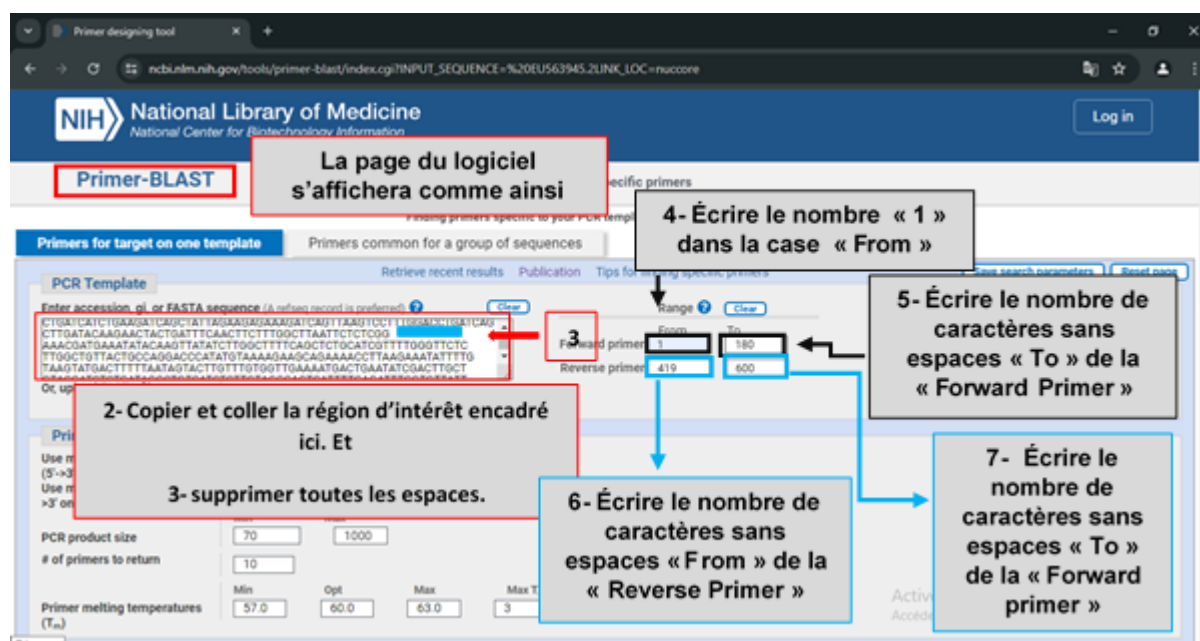


Figure 2.8. L'outil Primer-BLAST. (1) La page du logiciel s'affichera comme dans la figure dessus, ensuite (2) copier la région d'intérêt encadré du document Word et la coller dans la case « Enter accession, gi, or FASTA sequence » (encadrer en rouge), puis (3) supprimer les espaces entre les lignes (indiquer par la flèche rouge l'espace en bleu), ensuite (4,5,6,7) on détermine les amorces sens et anti sens (Forward et Reverse primers).

Afin s'optimiser les résultats, certains paramètres doivent être pris en considération lors de la conception des amorces (Figure 2.9).

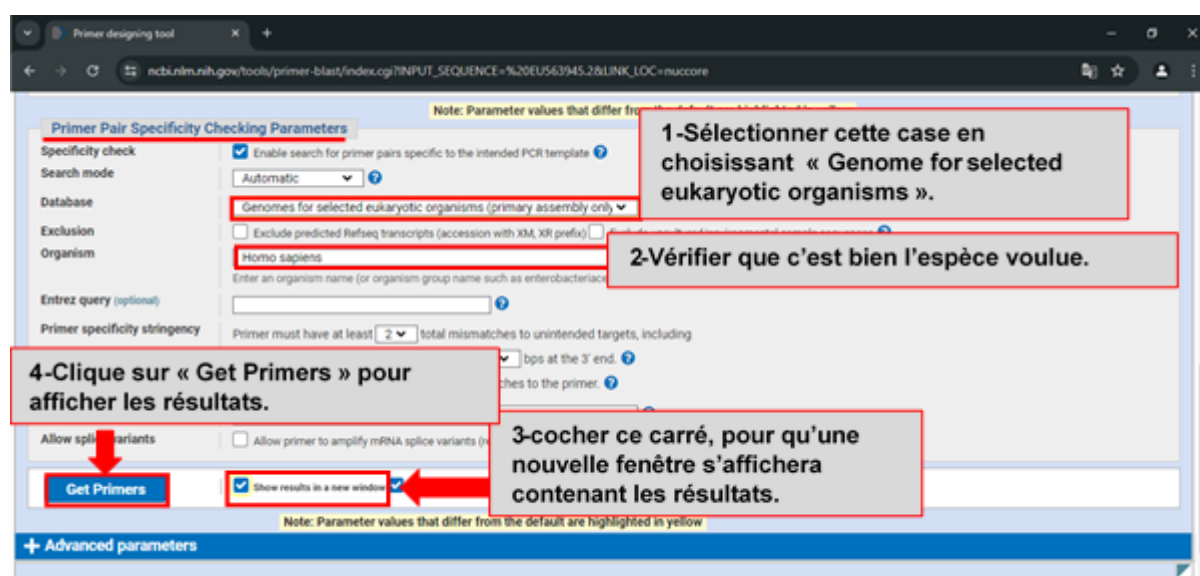


Figure 2.9. Primer Pair Specificity Checking Parameters. Faire défiler la page en bas, puis (1) sélectionner la case où c'est écrit « RefSeq mRNA » et choisir « Genomes for selected eukaryot oraganisms », ensuite (2) vérifier l'espèce que c'est bien « Homo sapiens », puis (3) cocher la case « Show results in a new window » pour que les résultats s'affichent dans une nouvelle fenêtre et après (4) cliquer sur « Get Primers » pour afficher les résultats.

2.2.3. Confirmation des résultats

2.2.3.1. Par *in-silico* PCR

Pour la confirmation des paires d'amorces que nous avons choisies et vérifier leur fiabilité, on réalise une *in-silico* PCR (PCR virtuelle) qui se fait par un programme dans la plateforme « UCSC genome browser » (genome.ucsc.edu) (Fig 3.7).



Figure 2.10. Confirmation des résultats par la plateforme « UCSC genome browser ». (1) Aller sur la plateforme « UCSC genome browser », puis (2) cliquer sur « Tools », ensuite (3) cliquer sur « *in-silico* PCR ».

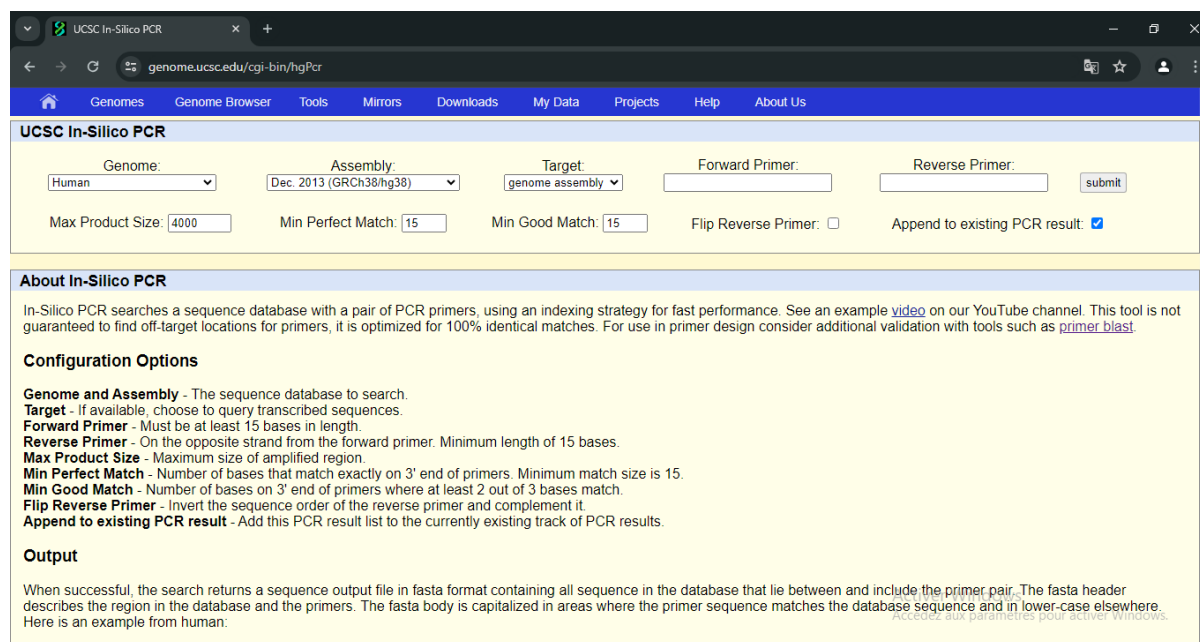


Figure 2.11. Le site *In-silico* PCR.

2.2.3.2. Par Primer-BLAST

On peut utiliser aussi l'outil Primer-BLAST pour la confirmation des paires d'amorces que nous avons choisis et vérifier leur fiabilité.

The screenshot displays the Primer-BLAST web interface. At the top, the URL is ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/. The page title is "Primer-BLAST" with the subtitle "A tool for finding specific primers". Below this, it states "Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST)".

The interface is divided into several sections:

- PCR Template:** Includes a text input field for "Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred)", a "Clear" button, and a "Range" dropdown with a "Clear" button. There are also input fields for "Forward primer" (with "From" and "To" sub-inputs) and "Reverse primer". A file upload section is present with the text "Or, upload FASTA file" and a button "Choisir un fichier" (Choose a file), with the status "Aucun fichier choisi" (No file chosen).
- Primer Parameters:** Contains several input fields:
 - "Use my own forward primer (5'→3' on plus strand)" with a "Clear" button.
 - "Use my own reverse primer (5'→3' on minus strand)" with a "Clear" button.
 - "PCR product size" with "Min" (70) and "Max" (1000) input fields.
 - "# of primers to return" with an input field set to 10.
 - "Primer melting temperatures (T_m)" with "Min" (57.0), "Opt" (60.0), "Max" (63.0), and "Max T_m difference" (3) input fields.
- Exon/intron selection:** Includes a dropdown for "Exon junction span" set to "No preference" and input fields for "Exon junction match" with "Min 5' match" (7), "Min 3' match" (4), and "Max 3' match" (8).

Figure 2.12. L'outil Primer-BLAST.

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 *IFNG* a passé par plusieurs étapes. D'abord, le site Ensembl a été utilisé afin d'avoir l'intégrité du gène *IFNG*. Ce gène se compose de 4 exons. Dans cette étude, nous avons choisi le premier exon. Ensuite, nous utilisons l'outil Primer-BLAST base sur la base de données NCBI. Cette dernière, nous a permis d'avoir 10 paires d'amorces propres au gène *IFNG* de l'exon 1.

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 3.1.

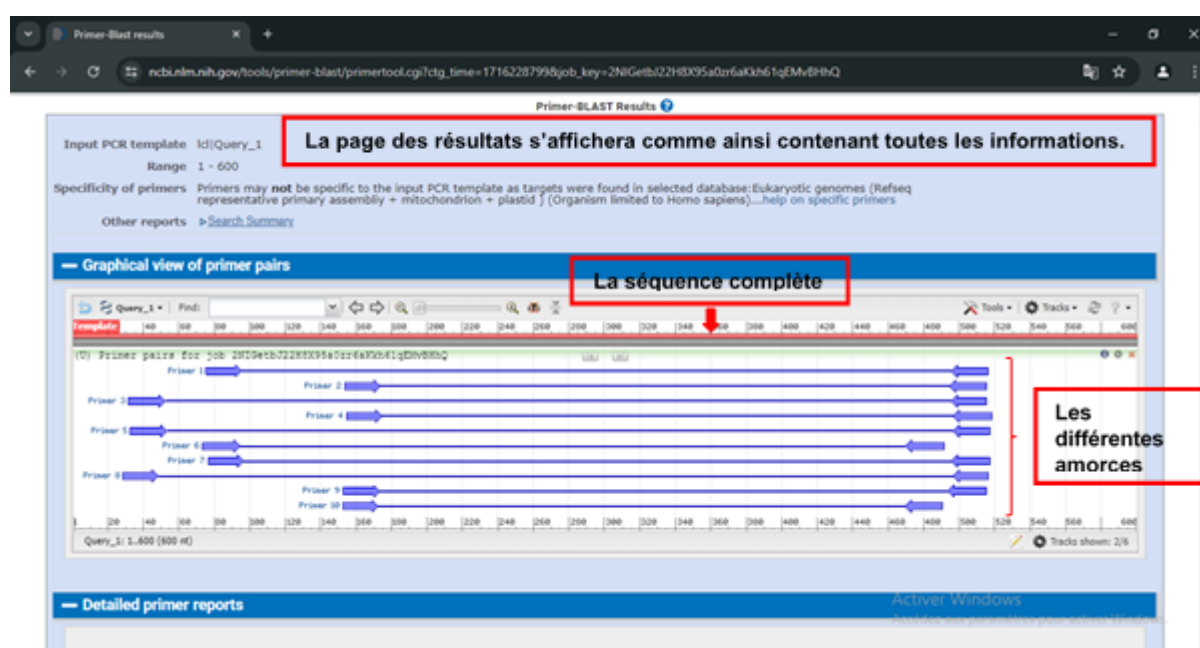


Figure 3.1. Résultats du Primer-BLAST.

Primer pair 1									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TCCCTGCCTATCTGTACCA	Plus	20	76	95	59.95	55.00	3.00	1.00
Reverse primer	TGCTACAAGATGACAGCC	Minus	21	516	496	59.79	52.38	3.00	1.00
Product length	441								

Figure 3.2. Primer pair 1.

Primer pair 6									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CATCCCTGCCTATCTGTACCA	Plus	21	74	94	59.93	57.14	3.00	1.00
Reverse primer	AGAGATGCTACAGCAAGTCGAT	Minus	22	491	470	59.31	45.45	6.00	2.00
Product length	418								

Figure 3.3. Primer pair 6.

Chapitre 3. Résultats

Primer pair 7									
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCCTGCCTATCTGTCAACAT	Plus	20	77	96	58.86	55.00	3.00	2.00
Reverse primer	CTGCCTACAAGAGATGACAGCC	Minus	22	517	496	60.74	54.55	3.00	1.00
Product length	441								

Figure 3.4. Primer pair 7.

Primer pair 9									
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AAATACCAGCAGCCAGAGGAG	Plus	21	153	173	59.79	52.38	3.00	0.00
Reverse primer	GCCTACAAGAGATGACAGCCTA	Minus	22	515	494	59.30	50.00	3.00	2.00
Product length	363								

Figure 3.5. Primer pair 9.

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

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		55 et 72 °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		
1	20	21	59.96	59.79	55	52.38	441	Tous plus de 1000pb
6	21	22	59.93	59.31	57.14	45.45	418	Tous plus de 1000pb
7	20	22	58.86	60.74	55	54.55	441	Tous plus de 1000pb
9	21	22	59.79	59.30	52.38	50	363	Tous plus de 1000pb

Pb, paire de base.

Nous avons choisi les 4 paires d'amorces et ceci pour les raisons suivantes (figure 3.2) (figure 3.3) (figure 3.4) (figure 3.5) et (tableau 3.1) :

- Les tailles de nos paires d'amorces que nous avons choisies sont inférieures à 1000 pb, donc les paires d'amorces sont bien spécifiques et contiennent moins de produits aspécifiques, et aussi ils y'en ont une longueur de >1000 sachant que la PCR n'amplifie pas des produits au-delà de 1000 Pb.
- Pour de meilleurs résultats d'hybridation, l'amorce a besoin d'une température entre 55°C à 72°C (cette température correspond à une longueur de l'amorce de 18-30 bases). Nos paires répondent parfaitement à ce critère car leurs températures correspondent à 58°C-59°C pour les amorces sens et 59-60°C pour les amorces anti-sens.
- 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 35 bases. Dans ce cas, nous avons choisi des paires d'amorces avec une longueur de 20 à 21 pour les amorces sens, et 21 à 22 pour les amorces anti-sens.

Chapitre 3. Résultats

- Et enfin, la teneur en GC est entre 55% à 57% pour les amorces- sens, et de 45% à 54% pour les amorces anti-sens. La teneur en GC d'une amorce doit être comprise entre 40 et 60%.

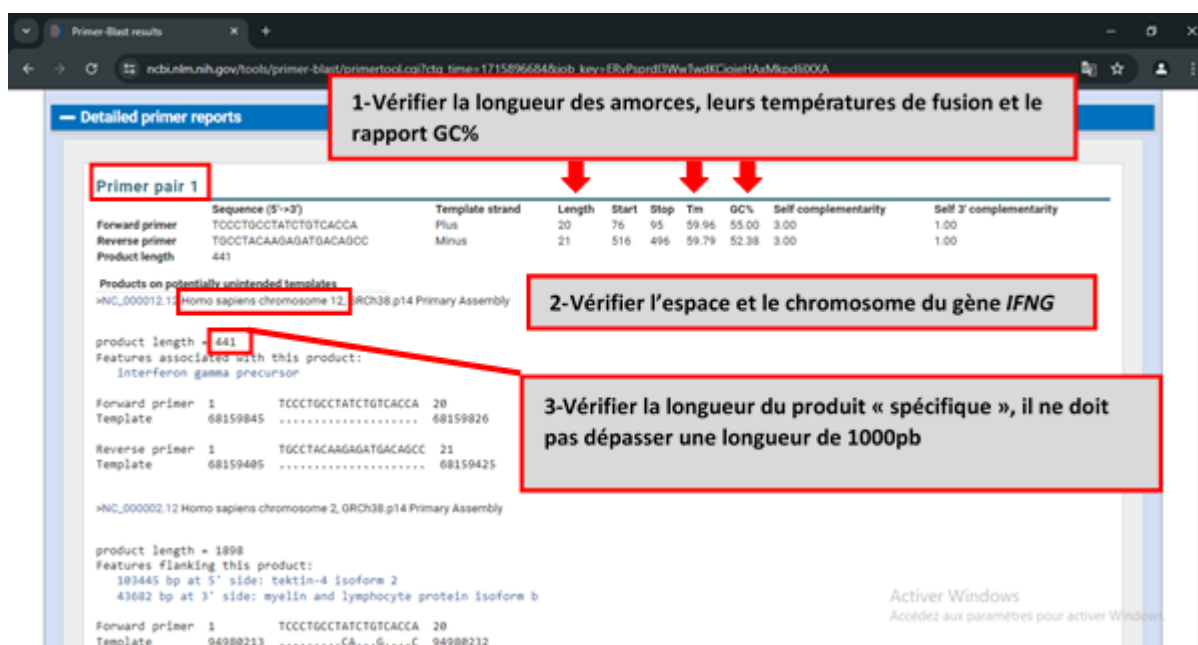


Figure 3.6. Résultats du Primer-BLAST. (1) Il faut vérifier la longueur des amorces, leurs températures d'hybridation et le rapport GC%, ensuite (2) il faut vérifier que c'est bien l'espace et le chromosome du gène voulu, puis (3) vérifier la longueur du produit spécifique <1000pb.

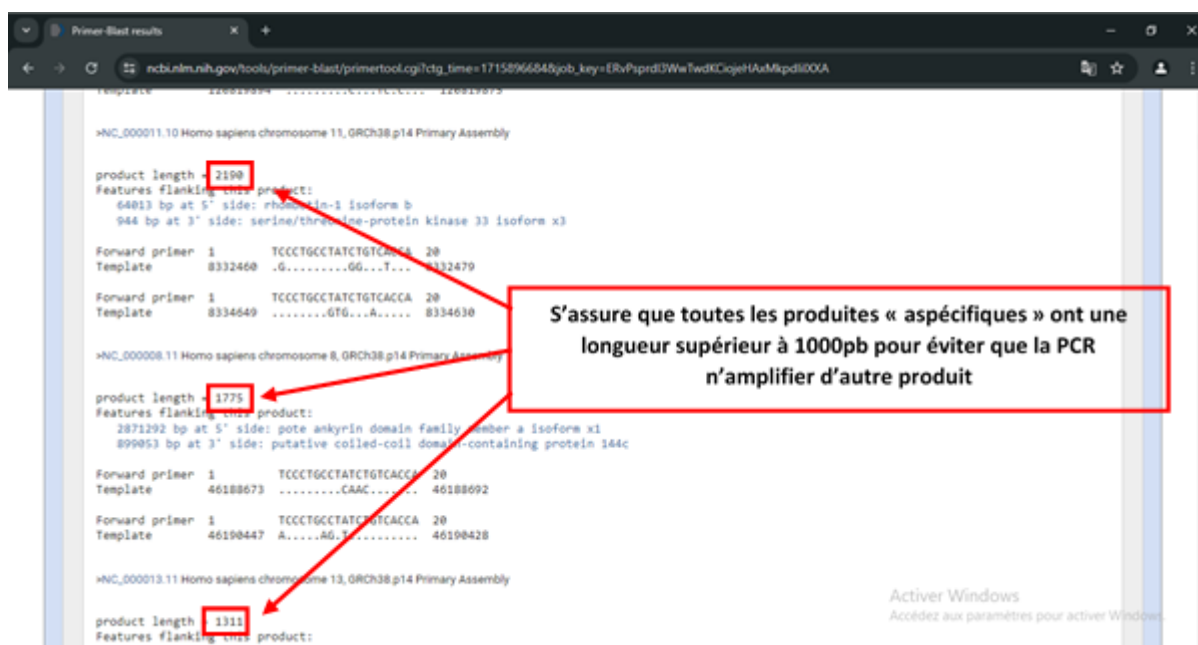


Figure 3.7. Résultats du primer-BLAST. S'assurer que tous les produits aspécifiques ont une taille de > 1000pb.

Ensuite, nous avons situé notre paire d'amorce dans la séquence du gène *IFNG* (Figure 3.8).

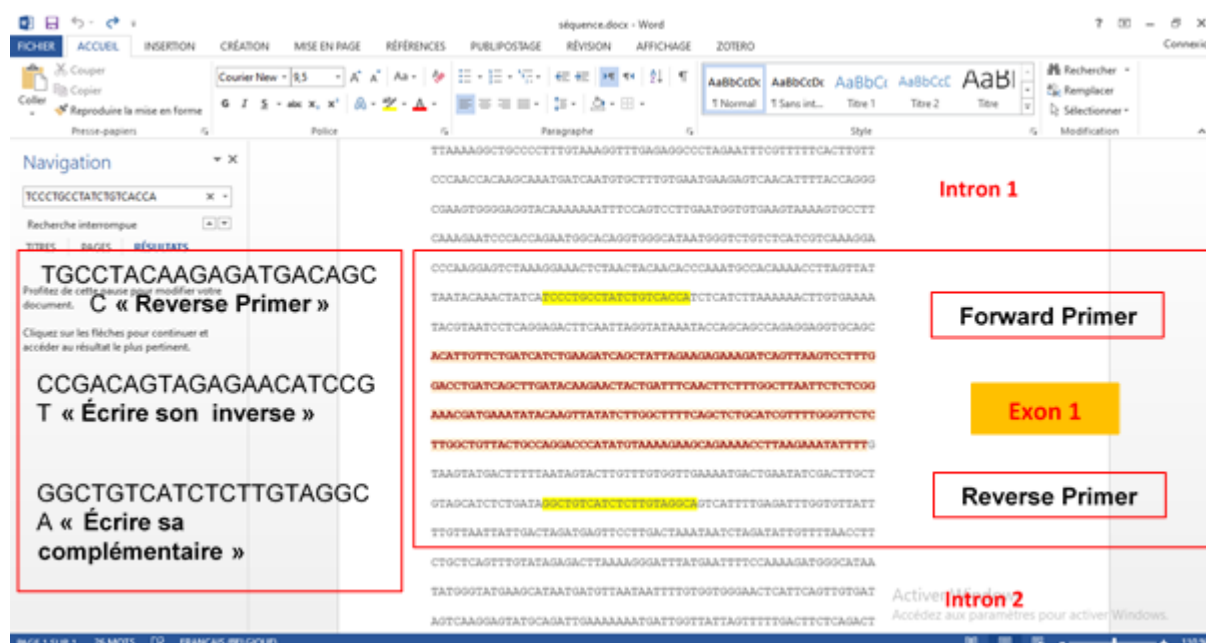


Figure 3.8. Les amorces encadrant la région d'intérêt. La paire d'amorces N°1 (en orange) encadrant la partie de la séquence de l'ADN qu'on veut amplifier du gène *IFNG* ; Forward Primer (amorce sens) (TCCCTGCCTATCTGTACCA), Reverse Primer (amorce anti-sens) (GGCTGTCATCTCTTGTAGGC).

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

Les résultats obtenus nous ont confirmés la taille des produits spécifiques obtenus ainsi que la spécificité des amorces conçues, les informations obtenues confirment aussi le chromosome 12 porteur du gène *IFNG*, la séquence des amorces et la température d'hybridation (Fig. 3.9). Donc, ce résultat nous a confirmé la fiabilité des amorces que nous avons choisies.

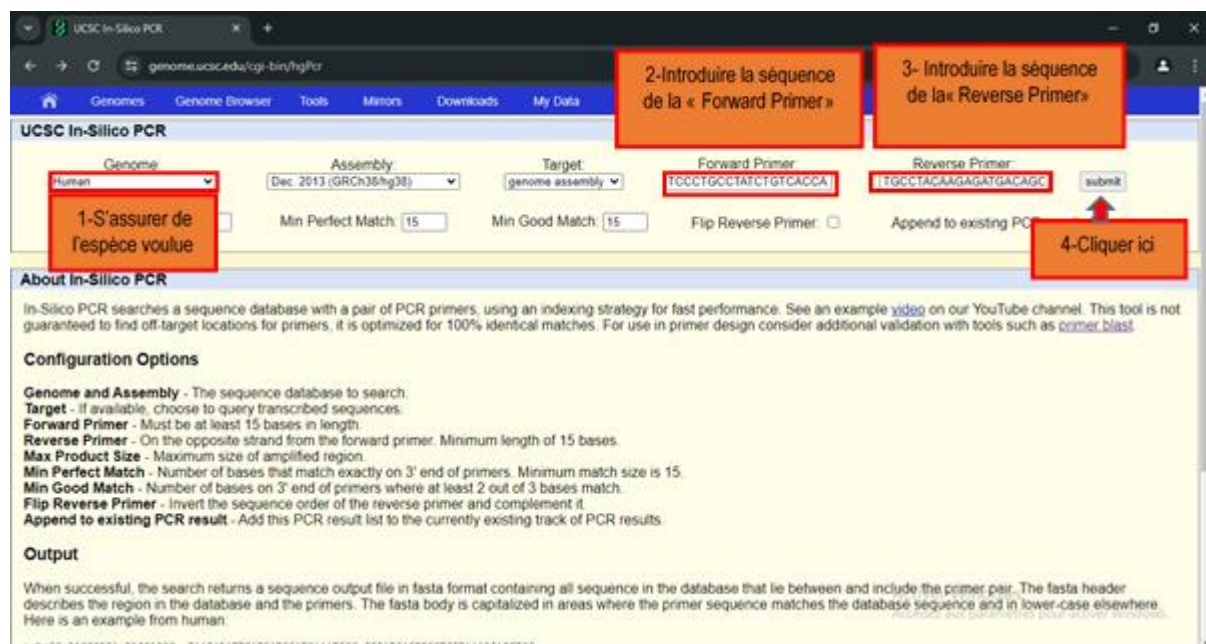


Figure 3.9. Confirmation des résultats sur la plateforme « UCSC genome browser ». (1) s'assurer l'espèce voulue. (2) entrer la séquence de la Forward Primer (l'amorce sens). (3) entrer la séquence de la Reverse Primer (l'amorce anti-sens) et (4) Cliquer sur submit.

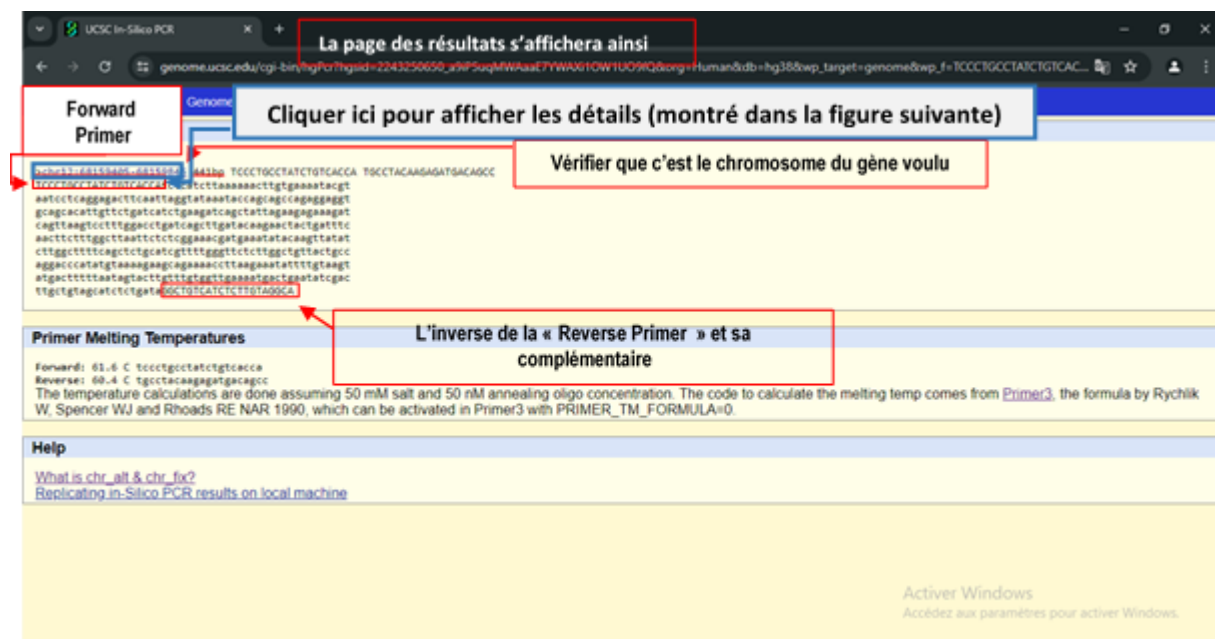


Figure 3.10. Résultats de la confirmation pour la première paire d'amorces. Un seul résultat est affiché comme en dessus, vérifier si la taille et le chromosome sont les mêmes que ceux de notre gène.

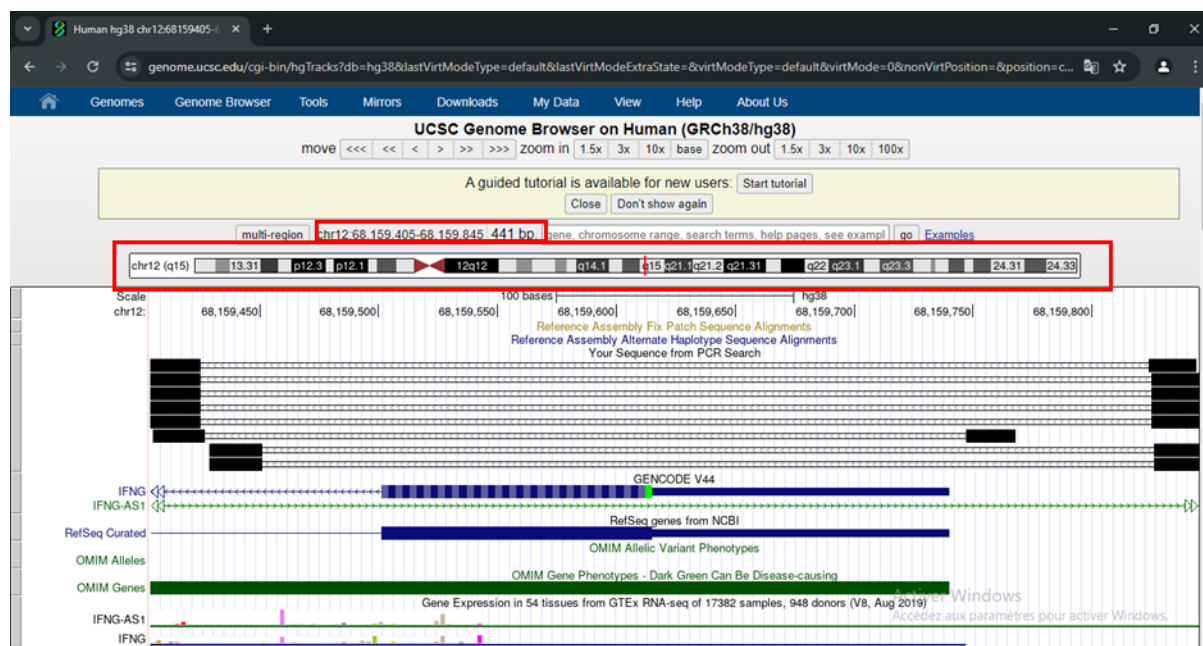


Figure 3.11. Résultats de la confirmation pour la première paire d'amorces.

Les trois paires d'amorces ont également été vérifiées par *in silico* PCR :

Chapitre 3. Résultats

The screenshot shows the UCSC In-Silico PCR tool interface. The browser address bar contains the URL: `genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?hgsid=2243250650_a9iP5uqMWAaaE7YWAX10W1U09fQ&org=Human&db=hg38&wp_target=genome&wp_f=%09CATCCCTGCCTATC...`. The page title is "UCSC In-Silico PCR".

UCSC In-Silico PCR

```
>chr12:68159430-68159847 418bp CATCCCTGCCTATCTGTCAACC AGAGATGCTACAGCAAGTCGAT
CATCCCTGCCTATCTGTCAACCATctcatcttaaaaaacttgtaaaatac
gtaatcctcaggagacttcaattaggataaataccagcagccagaggag
gtcagcacattgttctgatctctgaagatcagctattagaagagaag
atcagttaagtccttggacctgatcagcttgatacaagaactactgatt
tcaactcttggccttaattctctggaacgatgaatatacaagttat
atctggcttttcagctctgatctgtttgggtctcttggctgttactg
ccaggcccatatgtaaaagcagaacacttaagaatatttggtaa
gtatgacttttaatgacttgttgggtgaaatgactgaatctgc
ACTTGCTGATGATCTCT
```

Primer Melting Temperatures

Forward: 61.8 C catccctgcctatctgtcaacc
Reverse: 59.3 C agagatgctacagcaagtcgat
The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration. The code to calculate the melting temp comes from [Primer3](#), the formula by Rychlik W, Spencer WJ and Rhoads RE NAR 1990, which can be activated in Primer3 with PRIMER_TM_FORMULA=0.

Help

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

Activier Windows
Accédez aux paramètres pour activer Windows.

Figure 3.12. Résultats de la confirmation pour la deuxième paire d'amorces.

The screenshot shows the UCSC In-Silico PCR tool interface. The browser address bar contains the URL: `genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?hgsid=2243250650_a9iP5uqMWAaaE7YWAX10W1U09fQ&org=Human&db=hg38&wp_target=genome&wp_f=CCCTGCCTATCTGTCA...`. The page title is "UCSC In-Silico PCR".

UCSC In-Silico PCR

```
>chr12:68159404-68159844 441bp CCCTGCCTATCTGTCAACC CTGCTACAAGAGATGACAGCC
CCCTGCCTATCTGTCAACCATctcatcttaaaaaacttgtaaaatacgt
atctcaggagacttcaattaggataaataccagcagccagaggagtg
cagcacattgttctgatctctgaagatcagctattagaagagaagtc
agttaagtccttggacctgatcagcttgatacaagaactactgattca
acttcttggccttaattctctggaacgatgaatatacaagttatc
ttggctttcagctctcatcttgggttctcttggctgttactgcca
ggaccatagtaaaagcagaacacttaagaatatttggtaagta
tgacttttaatgacttgttgggtgaaatgactgaatctgact
tgcgtgacatctctgataggctgtctcttctgtatggcag
```

Primer Melting Temperatures

Forward: 60.0 C ccctgcctatctgtcaccat
Reverse: 61.3 C ctgctacaagagatgacagcc
The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration. The code to calculate the melting temp comes from [Primer3](#), the formula by Rychlik W, Spencer WJ and Rhoads RE NAR 1990, which can be activated in Primer3 with PRIMER_TM_FORMULA=0.

Help

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

Activier Windows
Accédez aux paramètres pour activer Windows.

Figure 3.13. Résultats de la confirmation pour la troisième paire d'amorces.

Chapitre 3. Résultats

UCSC In-Silico PCR

genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?hgsid=2243250650_a9iP5uqMWAaaE7YWX10W1U09fQ&org=Human&db=hg38&wp_target=genome&wp_f=AAATACCAGCAGCCAG...
Genomes Genome Browser Tools Mirrors Downloads My Data Projects Help About Us

UCSC In-Silico PCR

```
>chr12:68159496-68159768 363bp AAATACCAGCAGCCAGAGGAG GCCTACAAGAGATGACAGCCTA
AAATACCAGCAGCAGAGGAGgtgcagcacattgtctgcatctgaag
atcagctattgaagaaagatcagttaagtccttgaccctgacgc
tggatacaagaactactgattcaactcttggcttaattctcggaa
acgatgaaatatacaagtatatcttggctttcagctcctcatgtttt
gggttctcttggctgttactgcaggaccatataaaagagcagaaa
scctagagatatttgaagtatgactctttaaagtaactgttttg
gttgaatgactgaatcgcactgtgacatcttgaTAgGCTGTC
ATCTTGTAGGC
```

Primer Melting Temperatures

Forward: 60.8 C aaataccagcagccagaggg
Reverse: 58.6 C gcctacaagagatgacagccta
The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration. The code to calculate the melting temp comes from [Primer3](#), the formula by Rychlik W, Spencer WJ and Rhoads RE NAR 1990, which can be activated in Primer3 with PRIMER_TM_FORMULA=0.

Help

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

Activer Windows
Accédez aux paramètres pour activer Windows.

Figure 3.14. Résultats de la confirmation pour la quatrième paire d'amorces.

3.1.3. Résultats de la confirmation par Primer-BLAST

Les résultats obtenus nous ont confirmé la taille de produit spécifique obtenus et aussi la spécificité des amorces conçues. Les informations obtenues confirment aussi le chromosome 12 qui porte le gène *IFNG*, la séquence des amorces et leurs caractéristiques (la température, la longueur) (Fig. 3.15). Donc, ce résultat nous a confirmé la fiabilité des amorces que nous avons choisies.

Primer designing tool

ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?INPUT_SEQUENCE=%20(AAATACCAGCAGCCAGAGGAGGCCTACAAGAGATGACAGCCTA) &LINK_LOC=nuccore

Retrieve recent results Position tips for strong specific primers

PCR Template

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred) Clear

Or upload FASTA file Aucun fichier choisi

Range Clear

Forward primer

Reverse primer

Primer Parameters

Use my own forward primer (5'->3' on plus strand) **Forward Primer**

Use my own reverse primer (5'->3' on minus strand) **Reverse Primer**

PCR product size Min Max

of primers to return

Primer melting temperatures (T_m) Min Opt Max Max T_m difference

Exon/intron selection

A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section

Exon junction span

Exon junction match Min 5' match Min 3' match Max 3' match

Minimal and maximal number of bases that must anneal to exons at the 5' or 3' side of the junction

Intron inclusion Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA

Intron length range Min Max

Activer Windows
Accédez aux paramètres pour activer Windows.

Figure 3.15. Confirmation des résultats par l'outil Primer-BLAST.

Chapitre 3. Résultats

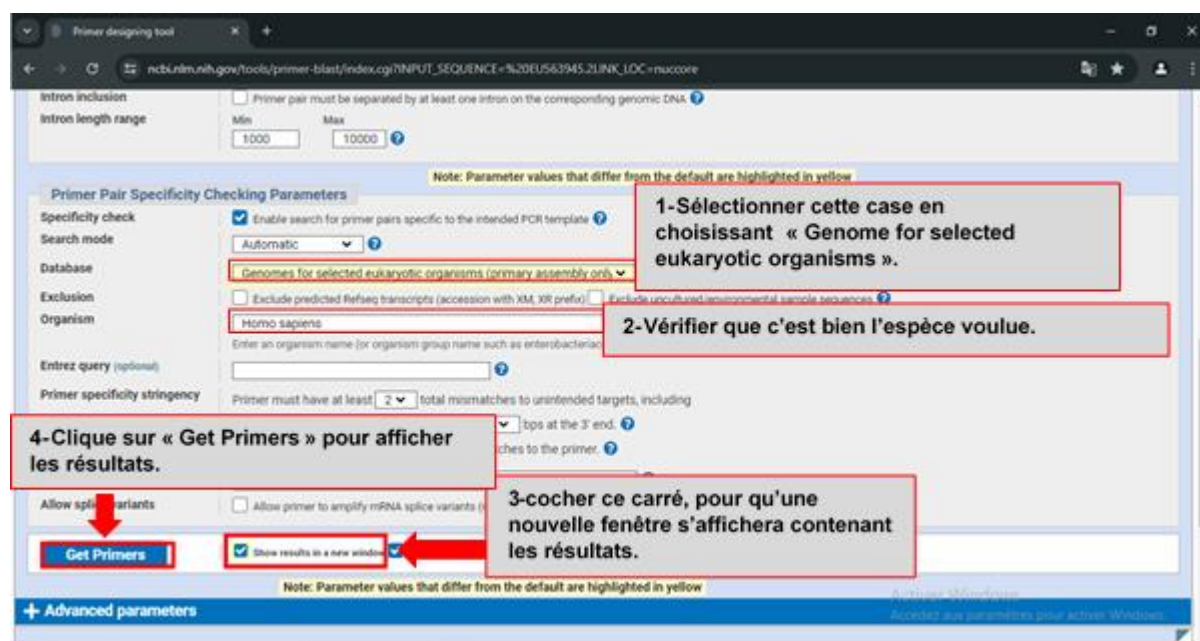


Figure 3.16. Confirmation des résultats par l'outil Primer-BLAST (Primer Pair Specificity Checking Parameters). Faites défiler la page en bas, puis (1) sélectionner la case où c'est écrit « RefSeq mRNA » et choisir « Genomes for selected eukaryot oraganisms », ensuite (2) vérifier l'espèce que c'est bien « Homo sapiens », puis (3) cocher la case « Show results in a new window » pour que les résultats s'affichent dans une nouvelle fenêtre et après (4) cliquer sur « Get Primers » pour afficher les résultats.

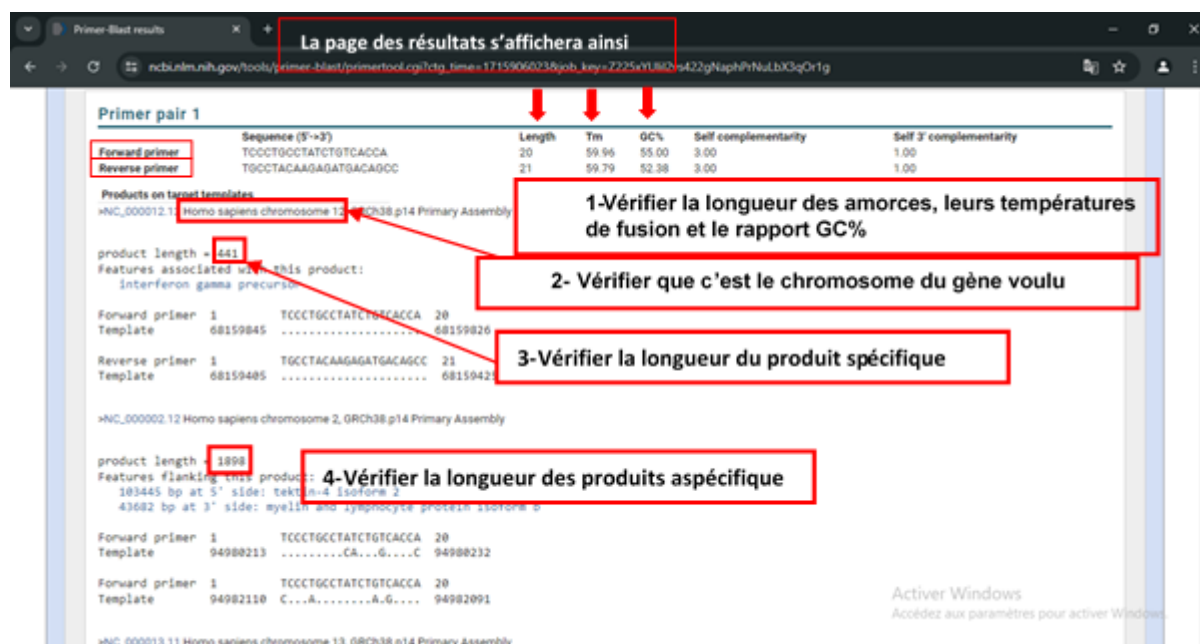


Figure 3.17. Résultats de la confirmation pour la première paire d'amorces.

Les trois paires d'amorces ont également été vérifiées par in Primer-BLAST :

Chapitre 3. Résultats

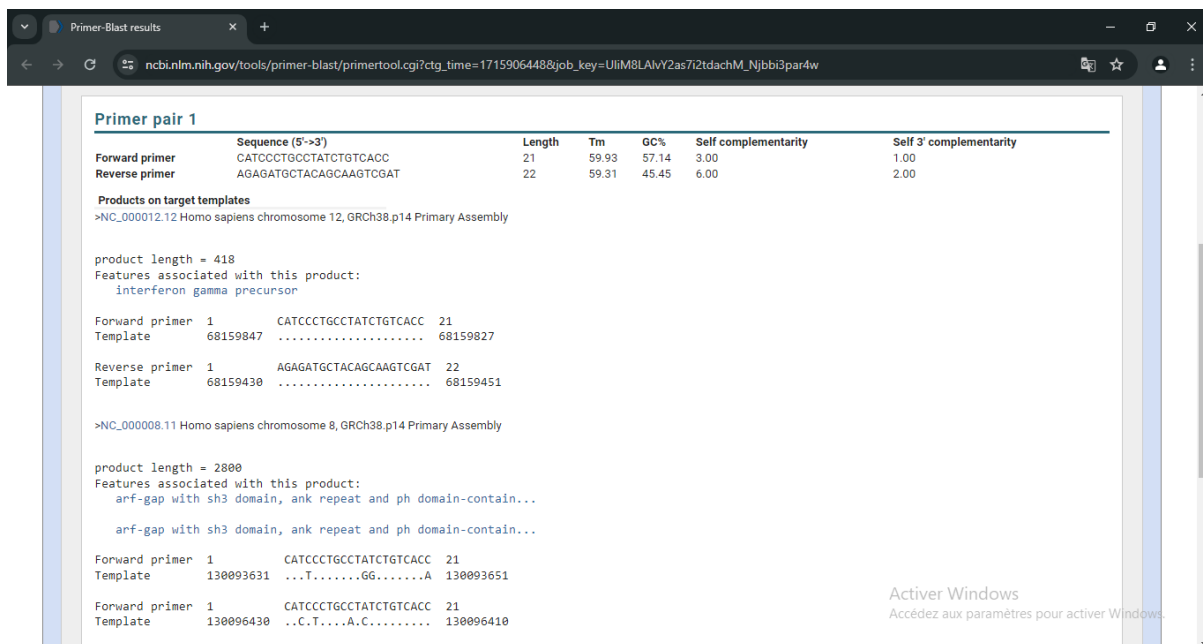


Figure 3.18. Résultats de la confirmation pour la deuxième paire d'amorces.

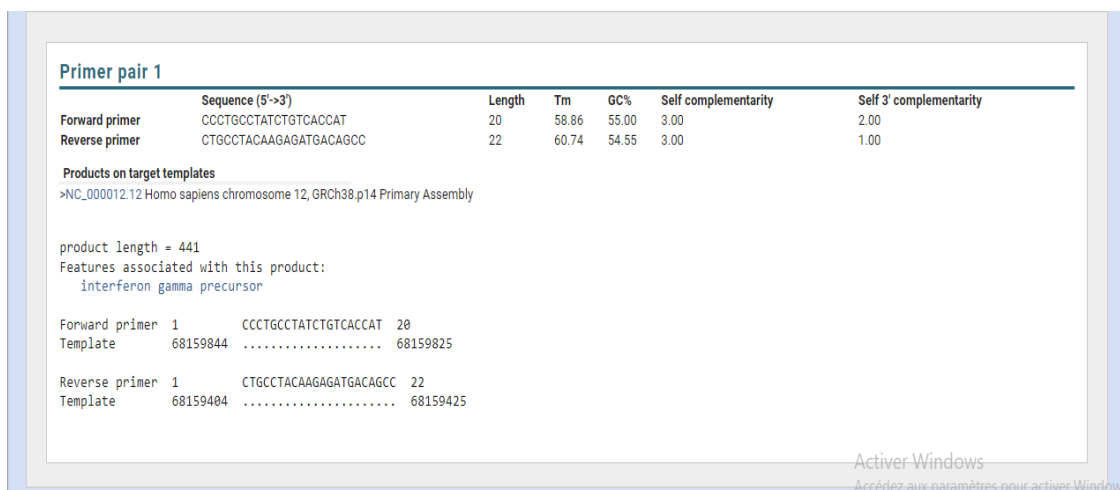


Figure 3.19. Résultats de la confirmation pour la troisième paire d'amorces.

Chapitre 3. Résultats

Primer-Blast results

ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi?ctg_time=1715906718&job_key=iJWkmmZl5DsGG1bNVFhxBOVLU73U-oOg

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AAATACCAGCAGCCAGAGGAG	21	59.79	52.38	3.00	0.00
Reverse primer	GCCTACAAGAGATGACAGCCTA	22	59.30	50.00	3.00	2.00

Products on target templates

>NC_000012.12 Homo sapiens chromosome 12, GRCh38.p14 Primary Assembly

product length = 363
Features associated with this product:
 interferon gamma precursor

Forward primer 1 AAATACCAGCAGCCAGAGGAG 21
Template 68159768 68159748

Reverse primer 1 GCCTACAAGAGATGACAGCCTA 22
Template 68159406 68159427

>NC_000010.11 Homo sapiens chromosome 10, GRCh38.p14 Primary Assembly

product length = 2142
Features flanking this product:
 89486 bp at 5' side: lysyl oxidase homolog 4 isoform x1
 29152 bp at 3' side: pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase domain-conta...

Forward primer 1 AAATACCAGCAGCCAGAGGAG 21
Template 98352504 TT.C.....T.....C 98352524

Forward primer 1 AAATACCAGCAGCCAGAGGAG 21
Template 98354645 .GCC.....G..... 98354625

Activier Windows
Accédez aux paramètres pour activer Windows.

Figure 3.20. Résultats de la confirmation pour la quatrième paire d'amorces.

Chapitre 4. Conclusions et perspectives

Les ILCs sont considérées comme des cellules de l'immunité innée qui contribuent aux réponses immunitaires précoces contre les agents pathogènes. Ces cellules n'expriment pas de récepteurs spécifiques aux antigènes et sont divisées en 3 principaux groupes. Les ILCs de type 1, formés par les ILC1s et les cellules NK productrices d'interféron γ (IFN- γ) et du facteur de nécrose tumorale (TNF)- α , possèdent des rôles contre les tumeurs et les agents pathogènes intracellulaires. Les ILCs de type 2 productrices d'IL-4, l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-13, sont impliquées dans les réponses immunitaires contre les parasites et aussi participent aux réactions allergiques et la réparation tissulaire. Les ILCs de type 3, sécrétrices d'IFN- γ , de l'IL-17 et de l'IL-22, comprennent les LTI, NCR- ILC3, et les NCR+ ILC3, sont impliquées dans l'élimination des infections bactériennes.

L'IFN γ est une protéine qui joue un rôle important lors de l'infection bactérienne. L'étude de son expression par les ILC1 et ILC3 au cours des infections par *P. aeruginosa* peut offrir de nouveaux moyens de lutte contre les maladies infectieuses. Cette étude demande la réalisation d'une PCR pour amplifier le gène *IFNG*.

Dans cette étude, nous avons conçu des amorces, à partir d'outils bio-informatiques, afin de pouvoir ensuite réaliser une PCR et amplifier le gène *IFNG*. Cette étape est importante dans la connaissance du devenir des maladies anti-infectieuses. Les paires d'amorces choisies répondent à tous les critères de choix de bonnes amorces. Ce résultat a été confirmé par une PCR virtuelle.

La réalisation de ce mémoire de fin d'étude nous a permis de s'initier à utiliser avec plusieurs outils comme la recherche des séquences d'ordre génomique, de comprendre les propriétés essentielles du bon choix d'amorces pour la réalisation d'une PCR fiable.

Chapitre 5. Bibliographie

- Abdi, Kaveh, Karen Laky, Mehrnoosh Abshari, Elizabeth M. Hill, Larry Lantz, Nevil J. Singh, et Eric O. Long. 2022. « Dendritic Cells Trigger IFN- γ Secretion by NK Cells Independent of IL-12 and IL-18 ». *European Journal of Immunology* 52 (9): 1431-40. <https://doi.org/10.1002/eji.202149733>.
- Almeida, F.F., et G.T. Belz. 2016a. « Innate Lymphoid Cells: Models of Plasticity for Immune Homeostasis and Rapid Responsiveness in Protection ». *Mucosal Immunology* 9 (5): 1103-12. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.64>.
- . 2016b. « Innate Lymphoid Cells: Models of Plasticity for Immune Homeostasis and Rapid Responsiveness in Protection ». *Mucosal Immunology* 9 (5): 1103-12. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.64>.
- Altare, Frédéric, et Jean-Laurent Casanova. 2001. « IL-12 et IFN- γ : un axe clé de l'immunité anti-mycobactérienne chez l'homme ». *médecine/sciences* 17 (11): 1112-19. <https://doi.org/10.1051/medsci/2001171111112>.
- 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>.
- Andreson, Reidar, Lauris Kaplinski, et Maida Remm. 2015. « Fast Masking of Repeated Primer Binding Sites in Eukaryotic Genomes ». In *PCR Primer Design*, édité par Chhandak Basu, 1275:1-16. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_1.
- Artis, David, et Hergen Spits. 2015. « The Biology of Innate Lymphoid Cells ». *Nature* 517 (7534): 293-301. <https://doi.org/10.1038/nature14189>.
- Azam, Mohd W., et Asad U. Khan. 2019. « Updates on the Pathogenicity Status of *Pseudomonas Aeruginosa* ». *Drug Discovery Today* 24 (1): 350-59. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.07.003>.
- 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>.
- Bank, Ute, Katrin Deiser, Carlos Plaza-Sirvent, Lisa Osbelt, Amelie Witte, Laura Knop, Rebecca Labrenz, et al. 2020. « C-FLIP Is Crucial for IL-7/IL-15-Dependent NKp46+ ILC Development and Protection from Intestinal Inflammation in Mice ». *Nature Communications* 11 (1): 1056. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14782-3>.
- Barbieri, J. T., et J. Sun. 2005. « *Pseudomonas Aeruginosa* ExoS and ExoT ». In *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 152:79-92. Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/s10254-004-0031-7>.

- Barker, Adam P., Adriana I. Vasil, Alain Filloux, Genevieve Ball, Paula J. Wilderman, et Michael L. Vasil. 2004. « A Novel Extracellular Phospholipase C of *Pseudomonas Aeruginosa* Is Required for Phospholipid Chemotaxis ». *Molecular Microbiology* 53 (4): 1089-98. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04189.x>.
- Beck, Katharina, Hiroshi Ohno, et Naoko Satoh-Takayama. 2020a. « Innate Lymphoid Cells: Important Regulators of Host–Bacteria Interaction for Border Defense ». *Microorganisms* 8 (9): 1342. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091342>.
- . 2020b. « Innate Lymphoid Cells: Important Regulators of Host-Bacteria Interaction for Border Defense ». *Microorganisms* 8 (9): 1342. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091342>.
- Bell, John. 1989. « The Polymerase Chain Reaction ». *Immunology Today* 10 (10): 351-55. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(89\)90193-X](https://doi.org/10.1016/0167-5699(89)90193-X).
- Bennik, Marjon H.J. 1999. « PSEUDOMONAS | *Pseudomonas Aeruginosa* ». In *Encyclopedia of Food Microbiology*, 1867-71. Elsevier. <https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.1295>.
- Bhardwaj, Snigdha, Sonam Bhatia, Shaminder Singh, et Francisco Franco Jr. 2021. « Growing Emergence of Drug-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* and Attenuation of Its Virulence Using Quorum Sensing Inhibitors: A Critical Review ». *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, n° Online First (mai). <https://doi.org/10.22038/ijbms.2021.49151.11254>.
- Bhat, Mohd Younis, Hitendra S. Solanki, Jayshree Advani, Aafaque Ahmad Khan, T. S. Keshava Prasad, Harsha Gowda, Saravanan Thiyagarajan, et Aditi Chatterjee. 2018a. « Comprehensive Network Map of Interferon Gamma Signaling ». *Journal of Cell Communication and Signaling* 12 (4): 745-51. <https://doi.org/10.1007/s12079-018-0486-y>.
- . 2018b. « Comprehensive Network Map of Interferon Gamma Signaling ». *Journal of Cell Communication and Signaling* 12 (4): 745-51. <https://doi.org/10.1007/s12079-018-0486-y>.
- Bouteiller, Mathilde, Charly Dupont, Yvann Bourigault, Xavier Latour, Corinne Barbey, Yoan Konto-Ghiorghi, et Annabelle Merieau. 2021. « *Pseudomonas* Flagella: Generalities and Specificities ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (7): 3337. <https://doi.org/10.3390/ijms22073337>.
- Burdman, Saul, Ofir Bahar, Jennifer K. Parker, et Leonardo De La Fuente. 2011a. « Involvement of Type IV Pili in Pathogenicity of Plant Pathogenic Bacteria ». *Genes* 2 (4): 706-35. <https://doi.org/10.3390/genes2040706>.
- . 2011b. « Involvement of Type IV Pili in Pathogenicity of Plant Pathogenic Bacteria ». *Genes* 2 (4): 706-35. <https://doi.org/10.3390/genes2040706>.

- Cabrolier, N., J. Lafolie, et X. Bertrand. 2014. « Épidémiologie et facteurs de risques des infections liées à *Pseudomonas aeruginosa* ». *Journal des Anti-infectieux* 16 (1): 8-12. <https://doi.org/10.1016/j.antinf.2014.01.001>.
- 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>.
- Casilag, Fiordiligie, Anne Lorenz, Jonas Krueger, Frank Klawonn, Siegfried Weiss, et Susanne Häussler. 2016. « The LasB Elastase of *Pseudomonas Aeruginosa* Acts in Concert with Alkaline Protease AprA To Prevent Flagellin-Mediated Immune Recognition ». Édité par B. A. McCormick. *Infection and Immunity* 84 (1): 162-71. <https://doi.org/10.1128/IAI.00939-15>.
- Castro, Flávia, Ana Patrícia Cardoso, Raquel Madeira Gonçalves, Karine Serre, et Maria José Oliveira. 2018a. « Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion ». *Frontiers in Immunology* 9 (mai):847. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00847>.
- . 2018b. « Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion ». *Frontiers in Immunology* 9 (mai):847. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00847>.
- . 2018c. « Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion ». *Frontiers in Immunology* 9 (mai):847. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00847>.
- 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>.
- Cobb, Laura M., et Michael R. Verneris. 2021. « Therapeutic Manipulation of Innate Lymphoid Cells ». *JCI Insight* 6 (6): e146006. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.146006>.
- Constantino-Teles, Pamela, Albane Jouault, Lhousseine Touqui, et Alessandra Mattos Saliba. 2022. « Role of Host and Bacterial Lipids in *Pseudomonas aeruginosa* Respiratory Infections ». *Frontiers in Immunology* 13 (juillet):931027. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.931027>.
- 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>.

- Cypowyj, Sophie, et Éric Vivier. 2016. « Les cellules innées lymphoïdes : des nouveaux acteurs de l'immunité ». *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* 200 (3): 561-74. [https://doi.org/10.1016/S0001-4079\(19\)30732-0](https://doi.org/10.1016/S0001-4079(19)30732-0).
- Da, De Luca. 2016. « Innate Lymphoid Cells: The Hidden Actors in Skin Disorders ». *Clinical Dermatology Open Access Journal* 1 (1). <https://doi.org/10.23880/CDOAJ16000101>.
- 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 (décembre):585319. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.585319>.
- DeBritto, Savitha, Tanzeembanu D. Gajbar, Praveen Satapute, Lalitha Sundaram, Ramachandra Yarappa Lakshmikantha, Sudisha Jogaiah, et Shin-ichi Ito. 2020. « Isolation and Characterization of Nutrient Dependent Pyocyanin from *Pseudomonas Aeruginosa* and Its Dye and Agrochemical Properties ». *Scientific Reports* 10 (1): 1542. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58335-6>.
- Delcour, Anne H., éd. 2013. *Bacterial Cell Surfaces: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology 966. New York, NY Heidelberg: Humana Press.
- Delidow, Beverly C., John P. Lynch, John J. Peluso, et Bruce A. White. 1993. « Polymerase Chain Reaction: Basic Protocols ». In *PCR Protocols*, par Bruce A. White, 15:1-30. New Jersey: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-244-2:1>.
- Dey, Pranab. 2018. « Polymerase Chain Reaction: Principle, Technique and Applications in Pathology ». In *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology*, par Pranab Dey, 201-11. Singapore: Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8252-8_20.
- Dianzani, Ferdinando. 1975. « Viral Interference and Interferon ». *La Ricerca in Clinica e in Laboratorio* 5 (3): 196-213. <https://doi.org/10.1007/BF02908284>.
- 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>.
- Dymond, Jessica S. 2013. « Explanatory Chapter ». In *Methods in Enzymology*, 529:279-89. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00023-9>.
- Ealick, S., W. Cook, S Vijay-Kumar, M Carson, T. Nagabushan, P. Trotta, et C. Bugg. 1991. « Three-Dimensional Structure of Recombinant Human Interferon-Gamma ». *Science* 252 (5006): 698-702. <https://doi.org/10.1126/science.1902591>.
- Eberl, Gérard, Marco Colonna, James P. Di Santo, et Andrew N. J. McKenzie. 2015. « Innate Lymphoid Cells: A New Paradigm in Immunology ». *Science* 348 (6237): aaa6566. <https://doi.org/10.1126/science.aaa6566>.

- Elemam, Noha, Suad Hannawi, et Azzam Maghazachi. 2017. « Innate Lymphoid Cells (ILCs) as Mediators of Inflammation, Release of Cytokines and Lytic Molecules ». *Toxins* 9 (12): 398. <https://doi.org/10.3390/toxins9120398>.
- Elemam, Noha Mousaad, Rakhee K. Ramakrishnan, Jennifer E. Hundt, Rabih Halwani, Azzam A. Maghazachi, et Qutayba Hamid. 2021. « Innate Lymphoid Cells and Natural Killer Cells in Bacterial Infections: Function, Dysregulation, and Therapeutic Targets ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11 (novembre):733564. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.733564>.
- Elkins, Kelly M. 2015a. « Primer Design for PCR Reactions in Forensic Biology ». In *PCR Primer Design*, édité par Chhandak Basu, 1275:17-30. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_2.
- . 2015b. « Primer Design for PCR Reactions in Forensic Biology ». In *PCR Primer Design*, édité par Chhandak Basu, 1275:17-30. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_2.
- Engel, Lee S., James M. Hill, Armando R. Caballero, Linda C. Green, et Richard J. O'Callaghan. 1998. « Protease IV, a Unique Extracellular Protease and Virulence Factor from *Pseudomonas Aeruginosa* ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (27): 16792-97. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.27.16792>.
- Erridge, Clett, Elliott Bennett-Guerrero, et Ian R. Poxton. 2002. « Structure and Function of Lipopolysaccharides ». *Microbes and Infection* 4 (8): 837-51. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01604-0](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01604-0).
- Farhana, Aisha, et Yusuf S. Khan. 2024. « Biochemistry, Lipopolysaccharide ». In *StatPearls Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554414/>.
- Garibyan, Lilit, et Nidhi Avashia. 2013. « Polymerase Chain Reaction ». *Journal of Investigative Dermatology* 133 (3): 1-4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>.
- Gauthier, Anna E., Randi D. Rotjan, et Jonathan C. Kagan. 2022. « Lipopolysaccharide Detection by the Innate Immune System May Be an Uncommon Defence Strategy Used in Nature ». *Open Biology* 12 (10): 220146. <https://doi.org/10.1098/rsob.220146>.
- 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>.
- Ghseini, Ghassan, et Zeinab Ezzeddine. 2022. « A Review of *Pseudomonas Aeruginosa* Metallophores: Pyoverdine, Pyochelin and Pseudopaline ». *Biology* 11 (12): 1711. <https://doi.org/10.3390/biology11121711>.

- Gibbs, Richard A. 1990. « DNA Amplification by the Polymerase Chain Reaction ». *Analytical Chemistry* 62 (13): 1202-14. <https://doi.org/10.1021/ac00212a004>.
- Goehring, Udo-Michael, Gudula Schmidt, Kristin J. Pederson, Klaus Aktories, et Joseph T. Barbieri. 1999. « The N-Terminal Domain of Pseudomonas aeruginosa Exoenzyme S Is a GTPase-Activating Protein for Rho GTPases ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (51): 36369-72. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.51.36369>.
- Golub, Rachel, et Ana Cumano. 2013. « Embryonic Hematopoiesis ». *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 51 (4): 226-31. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2013.08.004>.
- Green, Michael R., et Joseph Sambrook. 2018. « Hot Start Polymerase Chain Reaction (PCR) ». *Cold Spring Harbor Protocols* 2018 (5): pdb.prot095125. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095125>.
- . 2019a. « Amplification of cDNA Generated by Reverse Transcription of mRNA: Two-Step Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ». *Cold Spring Harbor Protocols* 2019 (5): pdb.prot095190. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095190>.
- . 2019b. « Polymerase Chain Reaction ». *Cold Spring Harbor Protocols* 2019 (6): pdb.top095109. <https://doi.org/10.1101/pdb.top095109>.
- Guia, Sophie, et Emilie Narni-Mancinelli. 2020. « Helper-like Innate Lymphoid Cells in Humans and Mice ». *Trends in Immunology* 41 (5): 436-52. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.03.002>.
- Hahn, Heinz P. 1997. « The Type-4 Pilus Is the Major Virulence-Associated Adhesin of Pseudomonas Aeruginosa – a Review ». *Gene* 192 (1): 99-108. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00116-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00116-9).
- Haiko, Johanna, et Benita Westerlund-Wikström. 2013. « The Role of the Bacterial Flagellum in Adhesion and Virulence ». *Biology* 2 (4): 1242-67. <https://doi.org/10.3390/biology2041242>.
- 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>.
- Hauser, Alan R. 2009. « The Type III Secretion System of Pseudomonas Aeruginosa: Infection by Injection ». *Nature Reviews Microbiology* 7 (9): 654-65. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2199>.
- Hsu, Amy T., Timothy A. Gottschalk, Evelyn Tsantikos, et Margaret L. Hibbs. 2021. « The Role of Innate Lymphoid Cells in Chronic Respiratory Diseases ». *Frontiers in Immunology* 12 (septembre):733324. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.733324>.

- 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 KLRG1hi Cells Are Multipotential 'Inflammatory' Type 2 Innate Lymphoid Cells ». *Nature Immunology* 16 (2): 161-69. <https://doi.org/10.1038/ni.3078>.
- Hubbard, T. 2002. « The Ensembl genome database project ». *Nucleic Acids Research* 30 (1): 38-41. <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.38>.
- Iglewski, Barbara H. 1996. « Pseudomonas ». In *Medical Microbiology*, édité par Samuel Baron, 4th éd. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8326/>.
- Ishino, Sonoko, et Yoshizumi Ishino. 2014. « DNA polymerases as useful reagents for biotechnology – the history of developmental research in the field ». *Frontiers in Microbiology* 5 (août). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00465>.
- Ishmael, Faoud T., et Cristiana Stellato. 2008. « Principles and Applications of Polymerase Chain Reaction: Basic Science for the Practicing Physician ». *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 101 (4): 437-43. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)60323-7](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)60323-7).
- Jacquelot, Nicolas, Cyril Seillet, Fernando Souza-Fonseca-Guimaraes, Adrian G. Sacher, Gabrielle T. Belz, et Pamela S. Ohashi. 2021. « Natural Killer Cells and Type 1 Innate Lymphoid Cells in Hepatocellular Carcinoma: Current Knowledge and Future Perspectives ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (16): 9044. <https://doi.org/10.3390/ijms22169044>.
- Jan-Abu, Sia C, Ahmed Kabil, et Kelly M McNagny. 2023. « Parallel Origins and Functions of T Cells and ILCs ». *Clinical and Experimental Immunology* 213 (1): 76-86. <https://doi.org/10.1093/cei/uxad056>.
- Jorgovanovic, Dragica, Mengjia Song, Liping Wang, et Yi Zhang. 2020a. « Roles of IFN- γ in Tumor Progression and Regression: A Review ». *Biomarker Research* 8 (1): 49. <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00228-x>.
- . 2020b. « Roles of IFN- γ in Tumor Progression and Regression: A Review ». *Biomarker Research* 8 (1): 49. <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00228-x>.
- Joshi, Mohini, et J. D. Deshpande. 2011. « POLYMERASE CHAIN REACTION: METHODS, PRINCIPLES AND APPLICATION ». *International Journal of Biomedical Research* 2 (1): 81-97. <https://doi.org/10.7439/ijbr.v2i1.83>.
- 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>.

- Kadri, Karim. 2020a. « Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications ». In *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*, édité par Madan L. Nagpal, Oana-Maria Boldura, Cornel Baltă, et Shymaa Enany. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86491>.
- . 2020b. « Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications ». In *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*, édité par Madan L. Nagpal, Oana-Maria Boldura, Cornel Baltă, et Shymaa Enany. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86491>.
- Kamali, Esmat, Ailar Jamali, Abdollah Ardebili, Freshteh Ezadi, et Alireza Mohebbi. 2020. « Evaluation of Antimicrobial Resistance, Biofilm Forming Potential, and the Presence of Biofilm-Related Genes among Clinical Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa* ». *BMC Research Notes* 13 (1): 27. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-4890-z>.
- 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/>.
- Killough, Matthew, Aoife Rodgers, et Rebecca Ingram. 2022a. « *Pseudomonas Aeruginosa*: Recent Advances in Vaccine Development ». *Vaccines* 10 (7): 1100. <https://doi.org/10.3390/vaccines10071100>.
- . 2022b. « *Pseudomonas Aeruginosa*: Recent Advances in Vaccine Development ». *Vaccines* 10 (7): 1100. <https://doi.org/10.3390/vaccines10071100>.
- Kiniwa, Tsuyoshi, et Kazuyo Moro. 2021. « Localization and Site-Specific Cell–Cell Interactions of Group 2 Innate Lymphoid Cells ». *International Immunology* 33 (5): 251-59. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxab001>.
- Kinsella, R. J., A. Kahari, S. Haider, J. Zamora, G. Proctor, G. Spudich, J. Almeida-King, et al. 2011. « Ensembl BioMarts: A Hub for Data Retrieval across Taxonomic Space ». *Database* 2011 (0): bar030-bar030. <https://doi.org/10.1093/database/bar030>.
- Kipnis, E., T. Sawa, et J. Wiener-Kronish. 2006. « Targeting Mechanisms of *Pseudomonas Aeruginosa* Pathogenesis ». *Médecine et Maladies Infectieuses* 36 (2): 78-91. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2005.10.007>.
- Klose, Christoph S. N., et David Artis. 2020. « Innate Lymphoid Cells Control Signaling Circuits to Regulate Tissue-Specific Immunity ». *Cell Research* 30 (6): 475-91. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0323-8>.
- Klose, Christoph S. N., Elina A. Kiss, Vera Schwierzeck, Karolina Ebert, Thomas Hoyler, Yannick d'Hargues, Nathalie Göppert, et al. 2013. « 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>.

- Konya, V., et J. Mjösberg. 2015. « Innate Lymphoid Cells in Graft-Versus-Host Disease ». *American Journal of Transplantation* 15 (11): 2795-2801. <https://doi.org/10.1111/ajt.13394>.
- Korchagina, Anna A., Ekaterina Koroleva, et Alexei V. Tumanov. 2021. « Innate Lymphoid Cells in Response to Intracellular Pathogens: Protection Versus Immunopathology ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11 (décembre):775554. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.775554>.
- . 2023. « Innate Lymphoid Cell Plasticity in Mucosal Infections ». *Microorganisms* 11 (2): 461. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020461>.
- Korchagina, Anna A., Sergey A. Shein, Ekaterina Koroleva, et Alexei V. Tumanov. 2023. « Transcriptional control of ILC identity ». *Frontiers in Immunology* 14 (mars):1146077. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1146077>.
- Krzewski, Konrad, et John E. Coligan. 2012. « Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis ». *Frontiers in Immunology* 3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00335>.
- Kumar, Amrita, Rashmi Kumari, Timothy Liu, Weiping Cao, Bruce A. Davidson, Paul R. Knight, et Suryaprakash Sambhara. 2021. « Human Innate Lymphoid Cells in Influenza Infection and Vaccination ». *Critical Reviews in Immunology* 41 (3): 57-82. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.2021040801>.
- Laarman, Alexander J., Bart W. Bardoel, Maartje Ruyken, Job Fernie, Fin J. Milder, Jos A. G. Van Strijp, et Suzan H. M. Rooijackers. 2012. « *Pseudomonas Aeruginosa* Alkaline Protease Blocks Complement Activation via the Classical and Lectin Pathways ». *The Journal of Immunology* 188 (1): 386-93. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102162>.
- Lamont, Iain L., Paul A. Beare, Urs Ochsner, Adriana I. Vasil, et Michael L. Vasil. 2002. « Siderophore-Mediated Signaling Regulates Virulence Factor Production in *Pseudomonas Aeruginosa* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (10): 7072-77. <https://doi.org/10.1073/pnas.092016999>.
- Larzul, D. 1989. « La PCR: principes et applications ». *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 4 (4): 19-IN6. [https://doi.org/10.1016/S0923-2532\(89\)80086-9](https://doi.org/10.1016/S0923-2532(89)80086-9).
- Leupold, Tamara, et Stefan Wirtz. 2022. « ILCs—Crucial Players in Enteric Infectious Diseases ». *International Journal of Molecular Sciences* 23 (22): 14200. <https://doi.org/10.3390/ijms232214200>.
- Lewenza, Shawn, Laetitia Charron-Mazenod, Shirin Afroj, et Erik Van Tilburg Bernardes. 2017. « Hyperbiofilm Phenotype of *Pseudomonas Aeruginosa* Defective for the PlcB and PlcN Secreted Phospholipases ». *Canadian Journal of Microbiology* 63 (9): 780-87. <https://doi.org/10.1139/cjm-2017-0244>.

- Li, Minghui, Zehui Wang, Wei Jiang, Yihan Lu, et Jun Zhang. 2023. « The role of group 3 innate lymphoid cell in intestinal disease ». *Frontiers in Immunology* 14 (avril):1171826. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1171826>.
- Li, Yan, Wei Wang, Sun Ying, Feng Lan, et Luo Zhang. 2021. « A Potential Role of Group 2 Innate Lymphoid Cells in Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis With Nasal Polyps ». *Allergy, Asthma & Immunology Research* 13 (3): 363. <https://doi.org/10.4168/aaair.2021.13.3.363>.
- Liao, Chongbing, Xin Huang, Qingxia Wang, Dan Yao, et Wuyuan Lu. 2022. « Virulence Factors of *Pseudomonas Aeruginosa* and Antivirulence Strategies to Combat Its Drug Resistance ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12 (juillet):926758. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.926758>.
- Lister, Philip D., Daniel J. Wolter, et Nancy D. Hanson. 2009. « Antibacterial-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms ». *Clinical Microbiology Reviews* 22 (4): 582-610. <https://doi.org/10.1128/CMR.00040-09>.
- Liu, Chen, Yandong Gong, Han Zhang, Hua Yang, Yang Zeng, Zhilei Bian, Qian Xin, et al. 2021. « Delineating Spatiotemporal and Hierarchical Development of Human Fetal Innate Lymphoid Cells ». *Cell Research* 31 (10): 1106-22. <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00529-2>.
- Liu, Harry Y., Grant C. Hopping, Uma Vaidyanathan, Yasmyne C. Ronquillo, Phillip C. Hoopes, et Majid Moshirfar. 2019. « Polymerase Chain Reaction and Its Application in the Diagnosis of Infectious Keratitis ». *Medical Hypothesis, Discovery & Innovation Ophthalmology Journal* 8 (3): 152-55.
- Liu, Qingyang, Jun Hee Lee, Hyun Min Kang, et Chang H. Kim. 2022. « Identification of the Niche and Mobilization Mechanism for Tissue-Protective Multipotential Bone Marrow ILC Progenitors ». *Science Advances* 8 (47): eabq1551. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abq1551>.
- Lo, Y. M. Dennis, et K. C. Allen Chan. 2006a. « Introduction to the Polymerase Chain Reaction ». In *Clinical Applications of PCR*, par Lo M., Chiu W.K Rossa, Chan K.C W.K Allen, et Chan K.C. Allen, 336:1-10. New Jersey: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59745-074-X:1>.
- . 2006b. « Introduction to the Polymerase Chain Reaction ». In *Clinical Applications of PCR*, par Lo M., Chiu W.K Rossa, Chan K.C W.K Allen, et Chan K.C. Allen, 336:1-10. New Jersey: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59745-074-X:1>.

- Lorenz, Todd C. 2012. « 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, Zhiyu, Jinsong Wang, Lei Hu, et Songlin Wang. 2023. « Function of Innate Lymphoid Cells in Periodontal Tissue Homeostasis: A Narrative Review ». *International Journal of Molecular Sciences* 24 (7): 6099. <https://doi.org/10.3390/ijms24076099>.
- Maheaswari, Rajendran, JaishreeTukaram Kshirsagar, et Nallasivam Lavanya. 2016. « Polymerase Chain Reaction: A Molecular Diagnostic Tool in Periodontology ». *Journal of Indian Society of Periodontology* 0 (0): 0. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.176391>.
- Mandal, Arundhati, et Chandra Viswanathan. 2015. « Natural Killer Cells: In Health and Disease ». *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy* 8 (2): 47-55. <https://doi.org/10.1016/j.hemonc.2014.11.006>.
- Mazgaeen, Lalita, et Prajwal Gurung. 2020. « Recent Advances in Lipopolysaccharide Recognition Systems ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (2): 379. <https://doi.org/10.3390/ijms21020379>.
- McNab, Finlay, Katrin Mayer-Barber, Alan Sher, Andreas Wack, et Anne O'Garra. 2015. « Type I Interferons in Infectious Disease ». *Nature Reviews Immunology* 15 (2): 87-103. <https://doi.org/10.1038/nri3787>.
- Mertowska, Paulina, Konrad Smolak, Sebastian Mertowski, et Ewelina Grywalska. 2023a. « Immunomodulatory Role of Interferons in Viral and Bacterial Infections ». *International Journal of Molecular Sciences* 24 (12): 10115. <https://doi.org/10.3390/ijms241210115>.
- . 2023b. « Immunomodulatory Role of Interferons in Viral and Bacterial Infections ». *International Journal of Molecular Sciences* 24 (12): 10115. <https://doi.org/10.3390/ijms241210115>.
- Metzemaekers, Mieke, Vincent Vanheule, Rik Janssens, Sofie Struyf, et Paul Proost. 2018. « Overview of the Mechanisms that May Contribute to the Non-Redundant Activities of Interferon-Inducible CXC Chemokine Receptor 3 Ligands ». *Frontiers in Immunology* 8 (janvier):1970. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01970>.
- Meyer, J M, A Neely, A Stintzi, C Georges, et I A Holder. 1996. « Pyoverdin Is Essential for Virulence of *Pseudomonas Aeruginosa* ». *Infection and Immunity* 64 (2): 518-23. <https://doi.org/10.1128/iai.64.2.518-523.1996>.
- 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>.

- Mojic, Marija, Kazuyoshi Takeda, et Yoshihiro Hayakawa. 2017. « The Dark Side of IFN- γ : Its Role in Promoting Cancer Immuno-evasion ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (1): 89. <https://doi.org/10.3390/ijms19010089>.
- Montaldo, Elisa, Kerstin Juelke, et Chiara Romagnani. 2015. « Group 3 Innate Lymphoid Cells (ILC3s): Origin, Differentiation, and Plasticity in Humans and Mice ». *European Journal of Immunology* 45 (8): 2171-82. <https://doi.org/10.1002/eji.201545598>.
- Moradali, M. Fata, Shirin Ghods, et Bernd H. A. Rehm. 2017. « *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7 (février). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>.
- Mortha, Arthur, et Kyle Burrows. 2018. « Cytokine Networks between Innate Lymphoid Cells and Myeloid Cells ». *Frontiers in Immunology* 9 (février):191. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00191>.
- Munita, Jose M., et Cesar A. Arias. 2016a. « Mechanisms of Antibiotic Resistance ». Édité par Indira T. Kudva et Qijing Zhang. *Microbiology Spectrum* 4 (2): 4.2.15. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>.
- . 2016b. « Mechanisms of Antibiotic Resistance ». In *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, édité par Indira T. Kudva, Nancy A. Cornick, Paul J. Plummer, Qijing Zhang, Tracy L. Nicholson, John P. Bannantine, et Bryan H. Bellaire, 481-511. Washington, DC, USA: ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555819286.ch17>.
- Nagasawa, Maho, Hergen Spits, et Xavier Romero Ros. 2018a. « 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>.
- . 2018b. « 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>.
- Naito, Maiko, et Atsushi Kumanogoh. 2023a. « Group 2 Innate Lymphoid Cells and Their Surrounding Environment ». *Inflammation and Regeneration* 43 (1): 21. <https://doi.org/10.1186/s41232-023-00272-8>.
- . 2023b. « Group 2 Innate Lymphoid Cells and Their Surrounding Environment ». *Inflammation and Regeneration* 43 (1): 21. <https://doi.org/10.1186/s41232-023-00272-8>.
- Narinyan, William, Nicole Poladian, Davit Orujyan, Areg Gargaloyan, et Vishwanath Venketaraman. 2022. « Immunologic Role of Innate Lymphoid Cells against Mycobacterial Tuberculosis Infection ». *Biomedicines* 10 (11): 2828. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10112828>.

- Nestorov, Jelena, Gordana Matić, Ivana Elaković, et Nikola Tanić. 2013. « Gene Expression Studies: How to Obtain Accurate and Reliable Data by Quantitative Real-Time RT PCR / IZUČAVANJE EKSPRESIJE GENA: KAKO DOBITI TAČNE I POUZDANE PODATKE KVANTITATIVNIM RT PCR-OM U REALNOM VREMENU ». *Journal of Medical Biochemistry* 32 (4): 325-38. <https://doi.org/10.2478/jomb-2014-0001>.
- Nudleman, Eric, et Dale Kaiser. 2004. « Pulling Together with Type IV Pili ». *Microbial Physiology* 7 (1-2): 52-62. <https://doi.org/10.1159/000077869>.
- Ochsner, Urs A., Paula J. Wilderman, Adriana I. Vasil, et Michael L. Vasil. 2002. « GeneChip[®] Expression Analysis of the Iron Starvation Response in *Pseudomonas Aeruginosa*: Identification of Novel Pyoverdine Biosynthesis Genes ». *Molecular Microbiology* 45 (5): 1277-87. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03084.x>.
- Orimo, Keisuke, Hirohisa Saito, Kenji Matsumoto, et Hideaki Morita. 2020. « Innate Lymphoid Cells in the Airways: Their Functions and Regulators ». *Allergy, Asthma & Immunology Research* 12 (3): 381. <https://doi.org/10.4168/aair.2020.12.3.381>.
- Panda, Santosh K., et Marco Colonna. 2019. « Innate Lymphoid Cells in Mucosal Immunity ». *Frontiers in Immunology* 10 (mai):861. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00861>.
- Pang, Zheng, Renee Raudonis, Bernard R. Glick, Tong-Jun Lin, et Zhenyu Cheng. 2019a. « 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>.
- . 2019b. « 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>.
- Pantazi, Eirini, et Nick Powell. 2019. « Group 3 ILCs: Peacekeepers or Troublemakers? What's Your Gut Telling You?! ». *Frontiers in Immunology* 10 (avril):676. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00676>.
- Parsons, James F., Bryan T. Greenhagen, Katherine Shi, Kelly Calabrese, Howard Robinson, et Jane E. Ladner. 2007. « Structural and Functional Analysis of the Pyocyanin Biosynthetic Protein PhzM from *Pseudomonas Aeruginosa* ». *Biochemistry* 46 (7): 1821-28. <https://doi.org/10.1021/bi6024403>.
- Passos Da Silva, Daniel, Melissa Schofield, Matthew Parsek, et Boo Tseng. 2017. « An Update on the Sociomicrobiology of Quorum Sensing in Gram-Negative Biofilm Development ». *Pathogens* 6 (4): 51. <https://doi.org/10.3390/pathogens6040051>.
- Paul, Sourav, et Girdhari Lal. 2017. « The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy ». *Frontiers in Immunology* 8 (septembre):1124. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01124>.

- Pellicic, Vladimir. 2008. « Type IV Pili: *E Pluribus Unum?* » *Molecular Microbiology* 68 (4): 827-37. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06197.x>.
- Pelletier, Abigaëlle, et Christian Stockmann. 2022. « The Metabolic Basis of ILC Plasticity ». *Frontiers in Immunology* 13 (avril):858051. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.858051>.
- Pestka, Sidney, Serguei V. Kotenko, Geetha Muthukumaran, Lara S. Izotova, Jeffrey R. Cook, et Gianni Garotta. 1997. « The Interferon Gamma (IFN- γ) Receptor: A Paradigm for the Multichain Cytokine Receptor ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 8 (3): 189-206. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(97\)00009-9](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(97)00009-9).
- Pier, G. 2007. « Pseudomonas Aeruginosa Lipopolysaccharide: A Major Virulence Factor, Initiator of Inflammation and Target for Effective Immunity ». *International Journal of Medical Microbiology* 297 (5): 277-95. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.03.012>.
- Platanias, Leonidas C. 2005. « Mechanisms of Type-I- and Type-II-Interferon-Mediated Signalling ». *Nature Reviews Immunology* 5 (5): 375-86. <https://doi.org/10.1038/nri1604>.
- Poniewierska-Baran, Agata, Beata Tokarz-Deptuła, et Wiesław Deptuła. 2021. « The role of innate lymphoid cells in selected disease states – cancer formation, metabolic disorder and inflammation ». *Archives of Medical Science* 17 (1): 196-206. <https://doi.org/10.5114/aoms.2019.89835>.
- Popko, Brian, Joshua G. Corbin, Kristine D. Baerwald, Jeffrey Dupree, et Annie M. Garcia. 1997. « The Effects of Interferon- γ on the Central Nervous System ». *Molecular Neurobiology* 14 (1-2): 19-35. <https://doi.org/10.1007/BF02740619>.
- 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* 2015:759348. <https://doi.org/10.1155/2015/759348>.
- Robinette, Michelle L., Jennifer K. Bando, Wilbur Song, Tyler K. Ulland, Susan Gilfillan, et Marco Colonna. 2017. « IL-15 Sustains IL-7R-Independent ILC2 and ILC3 Development ». *Nature Communications* 8 (1): 14601. <https://doi.org/10.1038/ncomms14601>.
- Rocchetta, H. L., L. L. Burrows, et J. S. Lam. 1999. « Genetics of O-Antigen Biosynthesis in *Pseudomonas Aeruginosa* ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63 (3): 523-53. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.3.523-553.1999>.
- Rožman, Primož, et Urban Švajger. 2018. « The Tolerogenic Role of IFN- γ ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 41 (juin):40-53. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2018.04.001>.

- Ryu, Seungwon, MinYeong Lim, Jinwoo Kim, et Hye Young Kim. 2023. « Versatile Roles of Innate Lymphoid Cells at the Mucosal Barrier: From Homeostasis to Pathological Inflammation ». *Experimental & Molecular Medicine* 55 (9): 1845-57. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01022-z>.
- Sainz-Mejías, Maite, Irene Jurado-Martín, et Siobhán McClean. 2020. « Understanding Pseudomonas Aeruginosa–Host Interactions: The Ongoing Quest for an Efficacious Vaccine ». *Cells* 9 (12): 2617. <https://doi.org/10.3390/cells9122617>.
- Sauvage, Salomé, et Julie Hardouin. 2020. « Exoproteomics for Better Understanding Pseudomonas Aeruginosa Virulence ». *Toxins* 12 (9): 571. <https://doi.org/10.3390/toxins12090571>.
- Sayers, E. W., T. Barrett, D. A. Benson, E. Bolton, S. H. Bryant, K. Canese, V. Chetvernin, et al. 2012. « Database Resources of the National Center for Biotechnology Information ». *Nucleic Acids Research* 40 (D1): D13-25. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1184>.
- Schroder, Kate, Paul J Hertzog, Timothy Ravasi, et David A Hume. 2004. « Interferon- γ : An Overview of Signals, Mechanisms and Functions ». *Journal of Leukocyte Biology* 75 (2): 163-89. <https://doi.org/10.1189/jlb.0603252>.
- 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>.
- Seillet, Cyril, Laurent Brossay, et Eric Vivier. 2021. « Natural Killers or ILC1s? That Is the Question ». *Current Opinion in Immunology* 68 (février):48-53. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2020.08.009>.
- Seillet, Cyril, Lisa A. Mielke, Daniela B. Amann-Zalcenstein, Shian Su, Jerry Gao, Francisca F. Almeida, Wei Shi, et al. 2016. « Deciphering the Innate Lymphoid Cell Transcriptional Program ». *Cell Reports* 17 (2): 436-47. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.025>.
- Seo, Goo-Young, Daniel A. Giles, et Mitchell Kronenberg. 2020. « The Role of Innate Lymphoid Cells in Response to Microbes at Mucosal Surfaces ». *Mucosal Immunology* 13 (3): 399-412. <https://doi.org/10.1038/s41385-020-0265-y>.
- Serafini, Nicolas, et James P. Di Santo. 2015. « Effector Cells of the Mucosal Immune System ». In *Mucosal Immunology*, 787-804. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415847-4.00039-2>.
- 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>.

- Shapira, Assaf, et Itai Benhar. 2010. « Toxin-Based Therapeutic Approaches ». *Toxins* 2 (11): 2519-83. <https://doi.org/10.3390/toxins2112519>.
- Shen, Yue, Jing Li, Si-Qi Wang, et Wei Jiang. 2018. « Ambiguous roles of innate lymphoid cells in chronic development of liver diseases ». *World Journal of Gastroenterology* 24 (18): 1962-77. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i18.1962>.
- Shi, Saimeng, Longyun Ye, Kaizhou Jin, Zhiwen Xiao, Xianjun Yu, et Weiding Wu. 2022. « Innate Lymphoid Cells: Emerging Players in Pancreatic Disease ». *International Journal of Molecular Sciences* 23 (7): 3748. <https://doi.org/10.3390/ijms23073748>.
- Shin, Samuel B., et Kelly M. McNagny. 2021. « ILC-You in the Thymus: A Fresh Look at Innate Lymphoid Cell Development ». *Frontiers in Immunology* 12 (mai):681110. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.681110>.
- Simoni, Yannick, et Evan W. Newell. 2018. « Dissecting Human ILC Heterogeneity: More than Just Three Subsets ». *Immunology* 153 (3): 297-303. <https://doi.org/10.1111/imm.12862>.
- Spits, Hergen, et Jenny Mjösberg. 2022. « Heterogeneity of Type 2 Innate Lymphoid Cells ». *Nature Reviews Immunology* 22 (11): 701-12. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00704-5>.
- Stier, Matthew T., et R. Stokes Peebles. 2020a. « Protocols for Studying Murine ILC Development ». In *Innate Lymphoid Cells*, édité par Shoba Amarnath, 2121:7-22. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0338-3_2.
- . 2020b. « Protocols for Studying Murine ILC Development ». In *Innate Lymphoid Cells*, édité par Shoba Amarnath, 2121:7-22. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0338-3_2.
- Strober, Warren. 2010. « The LT α Cell, an Immunologic Chameleon ». *Immunity* 33 (5): 650-52. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.11.016>.
- Sun, Jianjun, et Joseph T. Barbieri. 2003. « Pseudomonas Aeruginosa ExoT ADP-Ribosylates CT10 Regulator of Kinase (Crk) Proteins ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (35): 32794-800. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304290200>.
- Symowski, Cornelia, et David Voehringer. 2017. « Interactions between Innate Lymphoid Cells and Cells of the Innate and Adaptive Immune System ». *Frontiers in Immunology* 8 (octobre):1422. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01422>.
- Taggenbrock, Renske L.R.E., et Klaas P.J.M. Van Gisbergen. 2023a. « ILC1: Development, Maturation, and Transcriptional Regulation ». *European Journal of Immunology* 53 (2): 2149435. <https://doi.org/10.1002/eji.202149435>.

- . 2023b. « ILC1: Development, Maturation, and Transcriptional Regulation ». *European Journal of Immunology* 53 (2): 2149435. <https://doi.org/10.1002/eji.202149435>.
- Tau, G., et P. Rothman. 1999. « Biologic Functions of the IFN- γ Receptors ». *Allergy* 54 (12): 1233-51. <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.1999.00099.x>.
- 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. « 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>.
- Thiel, Dj, M-H Le Du, RI Walter, A D'Arcy, C Chène, M Fountoulakis, G Garotta, Fk Winkler, et Se Ealick. 2000. « Observation of an Unexpected Third Receptor Molecule in the Crystal Structure of Human Interferon- γ Receptor Complex ». *Structure* 8 (9): 927-36. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00184-2](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00184-2).
- Thomas, Christopher M., et R. Stokes Peebles. 2022. « Development and function of regulatory innate lymphoid cells ». *Frontiers in Immunology* 13 (octobre):1014774. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1014774>.
- Tuon, Felipe Francisco, Leticia Ramos Dantas, Paula Hansen Suss, et Victoria Stadler Tasca Ribeiro. 2022. « Pathogenesis of the Pseudomonas Aeruginosa Biofilm: A Review ». *Pathogens* 11 (3): 300. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030300>.
- Valle-Noguera, Ana, Anne Ochoa-Ramos, Maria José Gomez-Sánchez, et Aranzazu Cruz-Adalia. 2021. « Type 3 Innate Lymphoid Cells as Regulators of the Host-Pathogen Interaction ». *Frontiers in Immunology* 12 (septembre):748851. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.748851>.
- Valones, Marcela Agne Alves, Rafael Lima Guimarães, Lucas André Cavalcanti Brandão, Paulo Roberto Eleutério De Souza, Alessandra De Albuquerque Tavares Carvalho, et Sergio Crovela. 2009. « Principles and Applications of Polymerase Chain Reaction in Medical Diagnostic Fields: A Review ». *Brazilian Journal of Microbiology* 40 (1): 1-11. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000100001>.
- Van De Pavert, Serge A. 2023. « Layered Origins of Lymphoid Tissue Inducer Cells ». *Immunological Reviews* 315 (1): 71-78. <https://doi.org/10.1111/imr.13189>.
- Van Pelt-Verkuil, Elizabeth, Alex Van Belkum, et John P. Hays. 2008. *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. Dordrecht: Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6241-4>.

- Vassias, I. 2012. « Principe de l'amplification en chaîne par polymérase ». *EMC - Biologie médicale* 7 (1): 1-5. [https://doi.org/10.1016/S2211-9698\(12\)56773-7](https://doi.org/10.1016/S2211-9698(12)56773-7).
- Vetrivel, Aishwarya, Monica Ramasamy, Preethi Vetrivel, Santhi Natchimuthu, Shobana Arunachalam, Gon-Sup Kim, et Rajeswari Murugesan. 2021. « Pseudomonas Aeruginosa Biofilm Formation and Its Control ». *Biologics* 1 (3): 312-36. <https://doi.org/10.3390/biologics1030019>.
- 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>.
- Wagener, Brant M., Ruihan Hu, Songwei Wu, Jean-Francois Pittet, Qiang Ding, et Pulin Che. 2021. « The Role of Pseudomonas Aeruginosa Virulence Factors in Cytoskeletal Dysregulation and Lung Barrier Dysfunction ». *Toxins* 13 (11): 776. <https://doi.org/10.3390/toxins13110776>.
- 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>.
- Wang, Xianwei, Hui Peng, et Zhigang Tian. 2019. « Innate Lymphoid Cell Memory ». *Cellular & Molecular Immunology* 16 (5): 423-29. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0212-6>.
- Wedekind, Joseph E, Christine B Trame, Magdalena Dorywalska, Patrice Koehl, Tanya M Raschke, Marian McKee, David FitzGerald, R. John Collier, et David B McKay. 2001. « Refined Crystallographic Structure of Pseudomonas Aeruginosa Exotoxin A and Its Implications for the Molecular Mechanism of Toxicity 1 Edited by D. Rees ». *Journal of Molecular Biology* 314 (4): 823-37. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5195>.
- Whitmire, Jason K., Joyce T. Tan, et J. Lindsay Whitton. 2005. « Interferon- γ Acts Directly on CD8+ T Cells to Increase Their Abundance during Virus Infection ». *The Journal of Experimental Medicine* 201 (7): 1053-59. <https://doi.org/10.1084/jem.20041463>.
- Wick, M. J., A. N. Hamood, et B. H. Iglewski. 1990. « Analysis of the Structure-function Relationship of *Pseudomonas Aeruginosa* Exotoxin A ». *Molecular Microbiology* 4 (4): 527-35. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb00620.x>.
- Wojtkiewicz, M., J. Wiederin, et P. Ciborowski. 2016. « Proteomic Database Search and Analytical Quantification for Mass Spectrometry ». In *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry*, 193-210. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63688-1.00011-2>.
- Yahr, T L, J T Barbieri, et D W Frank. 1996. « Genetic Relationship between the 53- and 49-Kilodalton Forms of Exoenzyme S from *Pseudomonas Aeruginosa* ». *Journal of Bacteriology* 178 (5): 1412-19. <https://doi.org/10.1128/jb.178.5.1412-1419.1996>.

- 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 (1): 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>.
- Yong, Valerie F. L., Min Min Soh, Tavleen Kaur Jaggi, Micheál Mac Aogáin, et Sanjay H. Chotirmall. 2018. « The Microbial Endocrinology of *Pseudomonas Aeruginosa*: Inflammatory and Immune Perspectives ». *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 66 (5): 329-39. <https://doi.org/10.1007/s00005-018-0510-1>.
- Yu, Huiyang, Nicolas Jacquelot, et Gabrielle T. Belz. 2022. « Metabolic Features of Innate Lymphoid Cells ». *Journal of Experimental Medicine* 219 (11): e20221140. <https://doi.org/10.1084/jem.20221140>.
- Yuan, Xiaodong, Faiz Rasul, Björn Nashan, et Cheng Sun. 2021. « Innate Lymphoid Cells and Cancer: Role in Tumor Progression and Inhibition ». *European Journal of Immunology* 51 (9): 2188-2205. <https://doi.org/10.1002/eji.202049033>.
- Zaidi, M. Raza, et Glenn Merlino. 2011. « The Two Faces of Interferon- γ in Cancer ». *Clinical Cancer Research* 17 (19): 6118-24. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0482>.
- Zeng, Boning, Shengnan Shi, Gareth Ashworth, Changjiang Dong, Jing Liu, et Feiyue Xing. 2019a. « ILC3 Function as a Double-Edged Sword in Inflammatory Bowel Diseases ». *Cell Death & Disease* 10 (4): 315. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1540-2>.
- . 2019b. « ILC3 Function as a Double-Edged Sword in Inflammatory Bowel Diseases ». *Cell Death & Disease* 10 (4): 315. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1540-2>.
- Zheng, Haocheng, Yi Zhang, Jiachuang Pan, Nannan Liu, Yu Qin, Linghui Qiu, Min Liu, et Tieshan Wang. 2021. « The Role of Type 2 Innate Lymphoid Cells in Allergic Diseases ». *Frontiers in Immunology* 12 (juin):586078. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.586078>.
- Zheng, Mingzhu, et Jinfang Zhu. 2022a. « Innate Lymphoid Cells and Intestinal Inflammatory Disorders ». *International Journal of Molecular Sciences* 23 (3): 1856. <https://doi.org/10.3390/ijms23031856>.
- . 2022b. « Innate Lymphoid Cells and Intestinal Inflammatory Disorders ». *International Journal of Molecular Sciences* 23 (3): 1856. <https://doi.org/10.3390/ijms23031856>.
- Zhou, Suqing, Qianwen Li, Haijing Wu, et Qianjin Lu. 2020. « The Pathogenic Role of Innate Lymphoid Cells in Autoimmune-Related and Inflammatory Skin Diseases ». *Cellular & Molecular Immunology* 17 (4): 335-46. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0399-6>.

Résumé

Introduction : *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) est une bactérie à Gram négatif, pathogène qui provoque des infections aiguës et chroniques compliquées. Les cellules lymphoïdes innées (ILC, *Innate lymphoid cells*) sont des composants du système immunitaire inné, homologues aux lymphocytes T CD4 + et récemment identifiés. Les deux sous populations des ILCs « ILC1s et ILC3s » se caractérisent par la production de l'IFN- γ , une cytokine qui joue un rôle important dans l'élimination des infections bactériennes.

Objectif : Conception d'amorces du gène *IFNG* exprimé par les ILC1 et ILC3 afin de caractériser les populations des ILCs impliquées dans les infections à *P. aeruginosa*.

Matériel et méthodes : Afin de concevoir des amorces spécifiques du gène *IFNG*, on a utilisé plusieurs outils : la base de données « www.ensemble.org », pour trouver des séquences spécifiques du gène *IFNG* et un outil de primer-BLAST fourni par le NCBI pour concevoir des amorces. Les résultats sont confirmés par *in silico* PCR et primer-BLAST.

Résultats : L'utilisation de l'outil Primer-BLAST du site « www.ncbi.nih.gov » nous a permis d'obtenir des amorces spécifiques pour le gène *IFNG*, qui répondaient à tous les critères des bonnes amorces, et avec des produits aspécifiques supérieures à 1000Pb.

Conclusion : Le choix d'une bonne paire d'amorces pour amplifier le gène *IFNG* par PCR constitue une étape primordiale dans la réussite de cette technique et dans l'étude du rôle de ce gène dans l'immunité anti infectieuse.

Mots clés : *P. aeruginosa*, ILCs, *IFNG*, amorces, primer-Blast.

Abstract

Introduction:

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) is a Gram-negative bacterium and a pathogen that may cause complicated acute and chronic infections. Innate lymphoid cells (ILCs) are components of the innate immune system, homologous to CD4 + T helper cells (Th), and recently identified. The subpopulations of ILCs "1 and 3" can eliminate *P. aeruginosa* by the production of IFN- γ which plays several roles against bacterial infections, and encoded by the *IFNG* gene.

Objective :

Design of primers for the *IFNG* gene expressed by ILC1 and ILC3 in order to study its role during *P. aeruginosa* infections.

Materials and methods :

In order to design primers specific to the *IFNG* gene, several tools were used: the "www.ensemble.org" database to find specific sequence of the *IFNG* gene and a primer-BLAST tool provided by the NCBI to design primers. The results are confirmed by *in silico* PCR and primer-BLAST.

Results :

The use of the Primer-BLAST tool from the "www.ncbi.nih.gov" site allowed us to obtain specific primers for the *IFNG* gene, which met all the criteria for good primers, and with nonspecific products superior to 1000Pb.

Conclusion :

The choice of a good pair of primers to amplify the *IFNG* gene by PCR (Polymerase Chain Reaction) constitutes an essential step in the success of this technique and in the study of the role of this gene in anti-infectious immunity.

Keywords : *P. aeruginosa*, ILC1, ILC3, *IFNG*, primers

ملخص

مقدمة:

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) هي بكتيريا سالبة الجرام، وهي عامل مرض يسبب التهابات حادة ومزمنة معقدة. الخلايا اللمفاوية الفطرية (ILC) هي مكونات تم تحديدها مؤخرًا في الجهاز المناعي الفطري، وهي متماثلة مع خلايا CD4 + T المساعدة (Th). يمكن للمجموعات السكانية الفرعية لـ ILC "1 و 2" القضاء على *P. aeruginosa* بفضل إنتاج IFN- γ الذي يلعب عدة أدوار ضد العدوى البكتيرية، ويتم تشفيره بواسطة جين *IFNG*.

الهدف:

تصميم البادئات لجين *IFNG* المعبر عنه بـ ILC1 و ILC3 من أجل دراسة دوره خلال عدوى *P. aeruginosa*.

المواد والطرق:

من أجل تصميم بادئات خاصة بجين *IFNG*، تم استخدام العديد من الأدوات: قاعدة بيانات "www.ensemble.org" للعثور على تسلسلات محددة لجين *IFNG* وأداة primer-BLAST المقدمة من NCBI لتصميم البادئات. تم تأكيد النتائج بواسطة

PCR *In silico* و Primer-BLAST.

النتائج:

أتاح استخدام أداة Primer-BLAST من موقع "www.ncbi.nih.gov" الحصول على بادئات محددة لجين *IFNG*، والتي استوفت جميع معايير البادئات الجيدة، وبمنتجات غير محددة تفوق 1000.

الاستنتاجات:

يشكل اختيار زوج جيد من البادئات لتضخيم جين *IFNG* بواسطة PCR (تفاعل البوليميراز المتسلسل) خطوة أساسية في نجاح هذه التقنية وفي دراسة دور هذا الجين في المناعة المضادة للعدوى.

الكلمات المفتاحية: *P. aeruginosa*، ILC1، ILC3، *IFNG*

