



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



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

BOUKERCHE Meriem Kheira

En vue de l'option du

Diplôme de MASTER

En Immunologie

Thème :

Conception des amorces pour le gène *EOMES* exprimé par les cellules lymphoïdes types 1 (ILC1s) et son rôle lors de l'infection par *Pseudomonas aeruginosa*

Soutenu le lundi 24 Juin 2024 devant le jury composé :

Présidente	ZERHOUNI Khadidja	MAB	Université de Tlemcen
Encadrante	NOUARI Wafa	MCB	Université de Tlemcen
Examinatrice	MILIANI Maroua	MCB	Université de Tlemcen

Année Universitaire 2023/2024

Résumé

Introduction : Les cellules lymphoïdes innées (ILCs) jouent un rôle crucial dans la protection contre les infections bactériennes. Les sous populations des ILCs se distinguent par l'expression d'une grande variété de facteurs de transcription et la production d'une multitude de cytokines. L'*Eomesodermin* (*EOMES*) est une protéine exprimée par plusieurs cellules immunitaire et est impliquée dans la régulation de l'immunité de type 1 et la différenciation, ainsi que dans la maturation précoce des cellules NK.

Objectif : Elaboration des séquences d'oligonucléotides qui serviront d'amorces pour l'amplification du gène *Eomesodermin* par PCR.

Matériel et méthodes : afin de concevoir des amorces spécifiques du gène *EOMES*, quelques outils de la bioinformatique ont été utilisés. D'abord, la base de données ensembl.org a été utilisé pour rechercher des séquences spécifiques du gène *Eomesodermin*. Ensuite, l'outil "Primer-BLAST", fourni par NCBI, a été utilisé pour concevoir des amorces encadrant l'exon 3 du gène *Eomesodermin*. Enfin, la fiabilité des paires d'amorces répondant aux critères de bonnes amorces a été testée grâce à la PCR *in silico*.

Résultats : L'utilisation de l'outil Primer-BLAST m'a permis d'obtenir une amorce spécifique pour le gène *Eomesodermin*, à savoir :-Forward primer « CATCCCTCCGCTTTCTCCAT » , Révers primer « AGGCGAGCAAACAGGTCAC » avec un produit spécifique de 317 Pb, Tm (forward primer 59,53 °C, revers primer 60,60 °C), la teneur en GC est de 55% pour l'amorce Sens et de 57,89 pour l'amorce Anti-sens, et les deux amorces ont une longueur de 20 nucléotides.

Conclusion : La conception d'une paire d'amorces appropriée permettrait de réussir la technique PCR, ce qui permet d'amplifier correctement le gène *Eomesodermin* et d'étudier son rôle lors d'une infection bactérienne.

Mots clé : ILC1, *Eomesodermin*, Primer-BLAST, Primer.

Abstract

Introduction: Innate lymphoid cells (ILCs) play a crucial role in protection against bacterial infections. The subpopulations of ILCs are distinguished by the expression of a wide variety of transcription factors and the production of a multitude of cytokines. Eomesodermin (EOMES) is a protein expressed by several immune cells and is involved in the regulation of type 1 immunity and differentiation, as well as in the early maturation of NK cells.

Objective: Development of oligonucleotide sequences which will serve as primers for the amplification of the *Eomesodermin* gene by PCR.

Material and methods: in order to design specific primers for the *Eomesodermin* gene, some bioinformatics tools were used. First, the ensemble.org database was used to search for specific sequences of the *Eomesodermin* gene. Then, the “Primer-BLAST” tool, provided by NCBI, was used to design primers bordering exon 3 of the *Eomesodermin* gene. Finally, the reliability of the primer pairs meeting the criteria for good primers was tested using *in silico* PCR.

Results: The use of the Primer-BLAST tool allowed me to obtain a specific primer for the Eomesodermin gene, namely: -Forward primer “CATCCCTCCGCTTTCTCCAT”, Reverse primer “AGGCGAGCAAACAGGTCAC” with a specific product of 317 Pb, Tm (forward primer 59.53 °C, reverse primer 60.60 °C), the GC content is 55% for the Sens primer and 57.89 for the Anti-sense primer, and the two primers have a length of 20 nucleotides.

Conclusion: The design of an appropriate pair of primers would make the PCR technique successful, allowing the *Eomesodermin* gene to be correctly amplified and its role during bacterial infection to be studied.

Key words: ILC1, *Eomesodermin*, Primer-BLAST, Primer.

ملخص

مقدمة: تلعب الخلايا للمفاوية الفطرية (ILCs) دورًا حاسمًا في الحماية من الالتهابات البكتيرية. تتميز المجموعات الفرعية للـ ILCs بالتعبير عن مجموعة واسعة من عوامل النسخ وإنتاج عدد كبير من السيتوكينات (Eomesodermin (EOMES). هو بروتين يتم التعبير عنه بواسطة العديد من الخلايا المناعية ويشترك في تنظيم مناعة النوع الأول والتمايز، وكذلك في النضج المبكر للخلايا القاتلة الطبيعية.

الهدف: تطوير تسلسلات قليل النوكليوتيد والتي ستكون بمثابة الاشعال لتضخيم جين الأيوميزوديرمين بواسطة PCR.

المواد والطرق: من أجل تصميم بادئات محددة لجين Eomesodermin، تم استخدام بعض أدوات المعلوماتية الحيوية. أولاً، تم استخدام قاعدة بيانات ensemble.org للبحث عن تسلسلات محددة لجين Eomesodermin. بعد ذلك، تم استخدام أداة "Primer-BLAST"، المقدمة من NCBI، لتصميم الاشعال المتاخمة للإكسون 3 من جين Eomesodermin. أخيراً، تم اختبار موثوقية أزواج التمهيدي التي تستوفي معايير الاشعال الجيدة باستخدام silico PCR.

نتائج: أتاح لي استخدام أداة Primer-BLAST الحصول على برايمر محدد لجين Eomesodermin،

يسمى التمهيدي للكلمة "CATCCCTCCGCTTTCTCCAT"، التمهيدي العكسي "AGGCGAGCAAACAGGTCAC"

مع منتج محدد يبلغ Pb317، Tm (تمهيد أمامي 59.53 درجة مئوية، تمهيدي عكسي 60.60 درجة مئوية)، يكون محتوى GC 55% لمادة Sens التمهيدية و 57.89 لمادة Anti-sense التمهيدية، ويبلغ طول البادئين 20 نيوكليو تيدات.

خاتمة: إن تصميم زوج مناسب من البادئات من شأنه أن يجعل تقنية PCR ناجحة، مما يسمح بتضخيم جين Eomesodermin بشكل صحيح ودراسة دوره أثناء العدوى البكتيرية. الكلمات المفتاحية: ILC1، Primer، Primer-BLAST، Eomesodermin.

Avant Propos

En premier lieu, je remercie ALLAH le tout puissant de m'avoir guidé et donné la force et le courage d'aller jusqu'au bout de mes études.

Mes vifs remerciements à mon encadrante Dr. Wafa NOUARI, maître de conférences de classe B au département de Biologie-Université de Tlemcen, d'avoir dirigé mon travail et m'avoir apporté une aide précieuse en ces moments difficiles par ses précieux conseils et ses orientations.

Je tiens à remercier les membres de jury, Dr ZERHOUNI Khadidja comme présidente du Jury et Dr MILIANI Maroua comme examinatrice d'avoir accepté d'évaluer ce travail et de me consacrer un peu de leur temps, malgré leurs obligations personnelles, qu'elles trouvent ici ma gratitude.

J'exprime aussi mes sincères remerciements à l'ensemble des enseignants qui ont participé à ma formation en licence et Master pour leur soutien et leurs conseils durant mon cursus universitaire.

Je n'oublie pas de remercier toute l'équipe du Laboratoire BIOMOLIM et toute la promotion MASTER 2 immunologie 2023/2024 et toute personne qui m'a apportée son soutien de près ou loin durant la réalisation de ce travail.

Je dédie ce modeste travail à mes très chers parents, qui sont le symbole de force et de courage et sans qui je ne serais pas celle que je suis aujourd'hui et à mes sœurs Hannane et Souha, Je leur remercie pour tout le soutien et l'amour qu'elles me portent et qu'ALLAH les garde pour moi.

TABLE DES MATIERES

Résumé	III
Abstract	IV
Résumé en arabe	V
Avant-propos	VI
Table des matières	VII
Liste des figures	IX
Liste de l'abréviation	X
Introduction Générale	1
Chapitre 1. Revue de la littérature	3
1.1. Pseudomonas aeruginosa	3
1.1.1. Généralités de P. aeruginosa	3
1.1.2. Habitat de P. aeruginosa	3
1.1.3. Facteur de virulence	3
1.1.3.1. Facteur de virulence impliqué dans l'adhérence de la bactérie	4
1.1.3.1.1. Pili	4
1.1.3.1.2. Flagelle	4
1.1.3.1.3. Lipopolysaccharide (LPS)	5
1.1.3.1.4. Biofilm	5
1.1.3.2. Facteurs secrètes	6
1.1.3.2.1. Exotoxine A	6
1.1.3.2.2. Exoenzymes	6
1.1.3.2.3. Protéase	6
1.1.3.2.4. Phospholipase C	7
1.1.3.2.5. Pyocyanine	7
1.1.3.2.6. Pyoverdine	7
1.1.4. Résistance aux antibiotiques	7
1.2. Les cellules lymphoïdes innées	8
1.2.1. Historiques	8
1.2.2. Développement	8
1.2.3. Sous population	10
1.2.3.1. ILC de type 1	10
1.2.3.2. ILC de type 2	11
1.2.3.2. A. ILC2	11
1.2.3.2. B. ILC reg	11
1.2.3.3. ILC de type 3	11

1.2.4 Plasticité	11
1.2.5. Fonctions des ILCs	13
1.2.5.1. ILC1s	13
1.2.5.2. ILC2s	13
1.2.5.3. ILC3s	13
1.3. Protéine Eomesodermin	14
1.3.1. Définition	14
1.3.2. Gène Eomesodermin	14
1.3.3. Le rôle de la protéine EOMES dans ILCs	14
1.4. Réaction de polymérisation en chaîne	16
1.4.1. Définition	16
1.4.2. Principe	16
1.4.3. Acteur de la PCR	16
1.4.3.1. L'ADN polymérase	16
1.4.3.2. Les amorces	16
1.4.3.3. Les nucléotides d'NTPs	17
1.4.3.4. Ions du magnésium Mg^{2+}	17
1.4.4. Étape	17
1.4.4.1. Dénaturation	17
1.4.4.2. L'hybridation	17
1.4.4.3. Extension	17
1.4.5. Avantage de la PCR	18
1.5. Problématique et objectif	19
1.5.1. Problématiques	19
1.5.2. Objectif	19
1.5.3. But	19
Chapitre 2. Matériel et méthodes	20
2.1 Conception des amorces	20
2.2. Conception de la séquence du gène EOMES	21
2.2.1. Recherche de la séquence du gène EOMES	21
2.2.2. Le design des Primers : L'outil Primer-BLAST	22
2.2.3. Confirmation des résultats par In-Silico PCR	24
Chapitre 3. Résultats et discussion	25
3.1. Résultats de la conception des amorces	25
3.1.1. Résultats du Primer-BLAST	25
3.1.2. Résultats de confirmation	26
Chapitre 4. Conclusions et perspectives	28
Chapitre 5. Bibliographie	29

Liste des figures

Figure 1.1. Morphologie de <i>P. aeruginosa</i> représentant les facteurs de virulence associée à la cellule et extracellulaires	4
Figure 1.2. Structure du LPS de <i>P. aeruginosa</i>	5
Figure 1.3. Les étapes du développement du biofilm	6
Figure 1.4. Développement de cellules lymphoïdes innées	10
Figure 1.5. Plasticité des ILC	12
Figure 1.6 L'arbre phylogénétique schématique de la famille des gènes T-box	14
Figure 1.7. Localisation du gène <i>Eomes</i> (NCBI).	15
Figure 1.8. Mécanismes de régulation T-bet	15
Figure 1.9. Les étapes de la PCR	18
Figure 2.1. Plateforme de la base de données Ensembl	21
Figure 2.2. Résultat de la recherche du gène <i>Eomes</i>	21
Figure 2.3. Caractéristiques du gène <i>EOMES</i>	22
Figure 2.4. La séquence du gène <i>EOMES</i> depuis la plateforme « Ensembl	22
Figure 2.5. La séquence d'intérêt.	23
Figure 2.6. L'outil Primer – Blast	23
Figure 2.7. Paramètre de vérification de la spécificité de la paire d'amorces	24
Figure 2.8. L'outil in silico PCR	24
Figure 3.1. Résultats du primer –BLAST.	25
Figure 3.2. Primer pair	25
Figure 3.3. Résultats du Primer-BLAST	26
Figure 3.4. Résultats du Primer-BLAST	26
Figure 3.5. Confirmation des résultats sur la plateforme	27
Figure 3.6 Résultats de la confirmation	27

Listes d'Abréviations

A

ADN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique

C

°C : Celsius
CMP : précurseur myéloïde commun
CLP : précurseur lymphoïde commun
CILP : common innate lymphoid progenitor
CHILP : common helper innate lymphoid Progenitor
CD127 : cluster of differentiation
CXCR6: *motif chemokine receptor 6*

E

Eomes : Eomesodermin
EILP : progéniteurs lymphoïdes innés précoces

F

FLI1 : Friend leukemia integration 1

G

GATA3 : GATA binding protein 3

I

ILCs : cellules lymphoïdes innées
ILCP : cellule lymphoïde innée précurseur
iILC : ILC intra-épithéliale
IL : Interleukine
IFN : Interféron
iNOS : inductible nitric oxide synthase
Id2 : inhibiteur de la liaison à l'ADN2

L

LTi: inducteurs des tissus lymphoïdes
LPS : Lipopolysaccharide

M

Mg 2+ : Magnésium

N

NCBI : National Center for Biotechnology Information
NK : Natural killer
NKP : progéniteurs NK
NFIL3 : facteur nucléaire interleukine 3- Régulée

NF-κB : Facteur nucléaire kappa B
(*Nuclear factor-kappa B*)
Nt : Nucléotide

P

PLZF : promyelocytic leukaemia zinc finger
PCR : Polymerase chain reaction

R

RORγt : Récepteur gamma orphelin lié aux récepteurs de l'acide rétinoïque

T

Th1 : Lymphocyte T helper de type 1
Th2 : Lymphocyte T helper de type 2
Tm : Température de fusion (Melting Temperature)
TNF : Facteur de nécrose tumorale (Tumor necrosis factor)
TGF-β : Transforming Growth Factor-beta
T-bet : T-box-expressed-in-T -cells
Treg : cellule T régulatrice

Introduction

Introduction

L'immunité innée joue un rôle crucial dans l'élimination des infections bactériennes en constituant la première ligne de défense du corps. Les cellules immunitaires innées, telles que les macrophages et les neutrophiles, sont responsables de détecter et de combattre les agents pathogènes de manière rapide et non spécifique. Ces cellules sont impliquées dans la régulation de l'inflammation et la réponse immunitaire contre les infections bactériennes telles que celles causées par *P.aeruginosa*, une bactérie connue pour sa capacité à développer une résistance aux antibiotiques ce qui la rend difficile à traiter. D'autres cellules de l'immunité innée récemment découvertes qui sont les cellules lymphoïdes innées (ILCs) qui constituent une population des cellules dépourvues de récepteurs spécifiques aux antigènes, dont la diversité fonctionnelle ressemble de celle des effecteurs T helper (Th) de la réponse adaptative. On distingue trois principaux groupes d'ILC : ILC1, ILC2 et ILC3. Chaque groupe a des fonctions spécifiques dans la réponse immunitaire contre les infections bactériennes en régulant l'inflammation et en favorisant la réparation des tissus (Jacquetot et al. 2022).

Les ILCs du groupe 1 (ILC1s) forment une population cellulaire résidant dans les tissus et qui participent à la régulation de l'inflammation et de l'homéostasie (Taggenbrock et Van Gisbergen 2023). Ce groupe est constitué des ILC1s et des cellules NK qui sont associés à une réponse «TH1-like». Ces cellules expriment le facteur de transcription T-bet et Eomes qui sont très similaires et qui se lient au promoteur IFN- γ (Geginat et al. 2023). Le facteur de transcription T-bet est hautement homologue à la protéine Eomes qui est essentielle à la maturation précoce et la prolifération des cellules NK. D'autre part, les ILC1s sont des cellules sentinelles résidentes dans les tissus, en revanche les cellules NK peuvent être recrutées de la circulation vers le parenchyme des tissus infectés ou cancéreux. Les ILC1s produisent des cytokines telles que l'interféron-gamma (IFN- γ) et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) qui jouent un rôle essentiel dans la réponse immunitaire contre les virus, les bactéries et les tumeurs.

La caractérisation moléculaire du facteur de transcription EOME se fait par plusieurs techniques de biologie moléculaire, notamment la technique d'amplification en chaîne par polymérase (PCR, polymerase chain reaction) qui permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. La réussite de cette technique nécessite la présence de plusieurs éléments notamment l'ADN matrice, la taq polymérase et aussi des amorces qui permettent l'initiation de l'amplification.

Introduction

Dans cette perspective, mon travail consiste à concevoir des amorces qui seront utilisées pour amplifier une séquence du gène *Eomesodermin* exprimé par les ILC1s impliqués dans les agents pathogènes comme *P. aeruginosa*.

Chapitre 1 : Revue de la littérature

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

1.1.1. Généralités

Pseudomonas aeruginosa (*P.aeruginosa*) est une bactérie à Gram négatif de la famille des *Pseudomonadaceae* (Chaibdraa et al. 2008). *P. aeruginosa*, dénommé aussi « pyocyanique », est un bacille pigmenté (typiquement vert fluorescent grâce à deux pigments la pyoverdine et la pyocyanine). On décrit aussi des souches produisant un pigment rouge ou noir, de 1 à 3 µm de longueur et de 0,5 à 1 µm de largeur (Morand et Morand 2017).

En 1850, le scientifique Sédillot a remarqué que les pansements chirurgicaux des patients dans différents espaces ont été colorés avec une substance bleu-vert. Ensuite, en 1882, la bactérie a été découverte par le pharmacien Français Carle Gessard qu'il avait l'appelé *Bacillispyocyaneus* en basant sur la coloration bleue et verte des bandages. Actuellement, l'espèce *P. aeruginosa* est identifiée sur la base de comparaisons d'ARNr 16S et de séquences génomiques, d'analyses des acides gras cellulaires, de facteurs de virulence et de différenciation physiologique et biochimique (Wood, Kuzel, et Shafikhani 2023).

P. aeruginosa possède un très grand génome environ 6,3 million (M), ce qui lui permet une grande plasticité génomique et une importante adaptabilité à son environnement. De plus, il s'agit d'une bactérie aérobie stricte qui se développe rapidement (18–24 h) à une température de 37 °C (croissance possible entre 10 et 42 °C) (Stover et al. 2000).

1.1.2 Habitat

P.aeruginosa est un micro-organisme ubiquitaire, saprophyte des milieux hydriques vivant naturellement dans l'environnement. Son réservoir naturel et permanent est représenté par les sols humides, les végétaux et surtout les eaux (Bertrand et al. 2011).

1.1.3 Facteurs de virulence

La virulence de *P. aeruginosa* dépend d'un grand nombre de facteurs associés aux cellules et extracellulaires qui jouent un rôle important dans la colonisation, la survie de la bactérie et l'invasion des tissus (figure 1.1) (Ben Haj Khalifa et al. 2011).

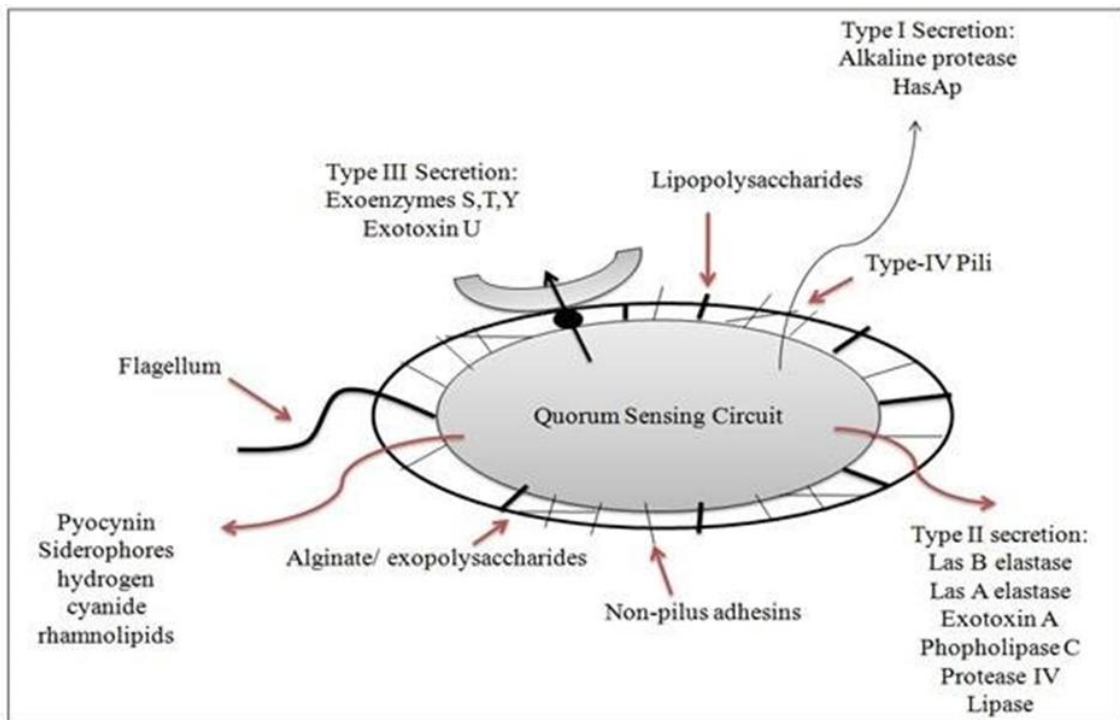


Figure 1.1. Morphologie de *P.aeruginosa* représentant les facteurs de virulence associée à la cellule et extracellulaires (Bhardwaj et al. 2021).

1.1.3.1. Facteurs de virulence impliqués dans l'adhérence de la bactérie

Plusieurs molécules d'adhésion associées à la surface, notamment les flagelles, les pili, les protéines de la membrane externe, les lipopolysaccharides et les exopolysaccharides, médient l'attachement de *P. aeruginosa* aux cellules épithéliales et aux surfaces abiotiques. (Beaussart et al. 2014).

1.1.3.1.1. Pili

Les pili ou fimbriae sont l'une des formes les plus courantes de structures de surface bactériennes et archéennes, impliquées dans l'adhérence, la motilité, la compétence pour l'absorption de l'ADN et la pathogénèse (Burrows 2012). Ces structures sont également impliquées dans la colonisation de l'hôte et à la formation de biofilm (Beaussart et al. 2014). Les pili sont composés de milliers de molécules d'une petite protéine monomère appelée la piline majeure (PilA). PilA est formée de trois domaines : une région d'hélice α N-terminale hydrophobe hautement conservée, une région centrale hypervariable et une région C-terminale semi-conservée contenant le domaine de liaison à l'hôte (Jurado-Martín, Sainz-Mejías, et McClean 2021).

1.1.3.1.2. Flagelle

Le flagelle est essentiel pour assurer la mobilité de la bactérie et facilite l'acquisition de nutriments. Il joue un rôle indirect dans l'adhésion cellulaire et dans les stades précoces du

Chapitre 1 : Revue de la littérature

développement du biofilm bactérien *in vitro* (Q. Duan et al. 2013). Les flagelles chez *P. aeruginosa* sont situés au pôle de la cellule et sont ainsi appelés flagelles polaires (Bouteiller et al. 2021).

1.1.3.1.3. Lipopolysaccharide

Le principal constituant de la membrane externe des bactéries à Gram négatif est le lipopolysaccharide (LPS) composé du lipide A, de l'oligosaccharide central et de l'antigène O (O-PS, également appelé O-antigène), qui est une longue chaîne polysaccharidique s'étendant dans l'environnement extracellulaire (figure 1.2) (Huszczynski, Lam, et Khursigara 2019).

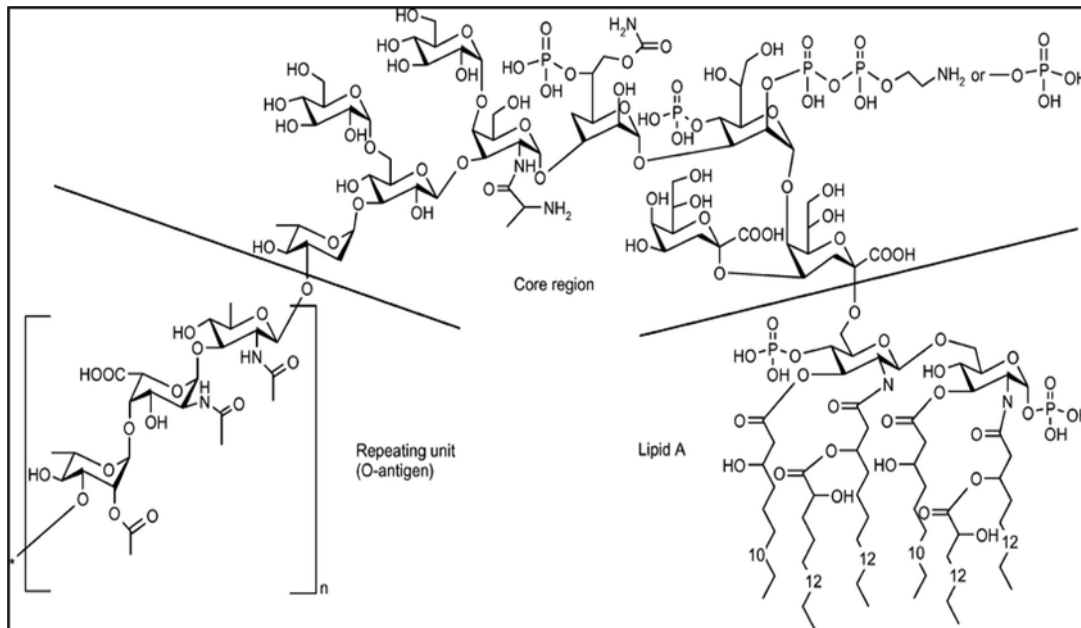


Figure 1.2. Structure du LPS de *P.aeruginos*(Barkleit, Moll, et Bernhard 2008).

1.1.3.1.4. Biofilm

Le mot biofilm a été utilisé en 1978 pour désigner une communauté de microorganismes enrobés d'une matrice hydratée, riche en polymères extracellulaires, et en contact avec une surface (Lebeaux et Ghigo 2012). La formation de biofilm permet de protéger les bactéries et de survivre dans des conditions environnementales(Tremblay, Hathroubi, et Jacques 2014). Cette formation est généralement décrite comme une succession d'étapes : adhésion, croissance en surface, maturation puis dispersion (figure 1.3) (Douarche et al. 2018).

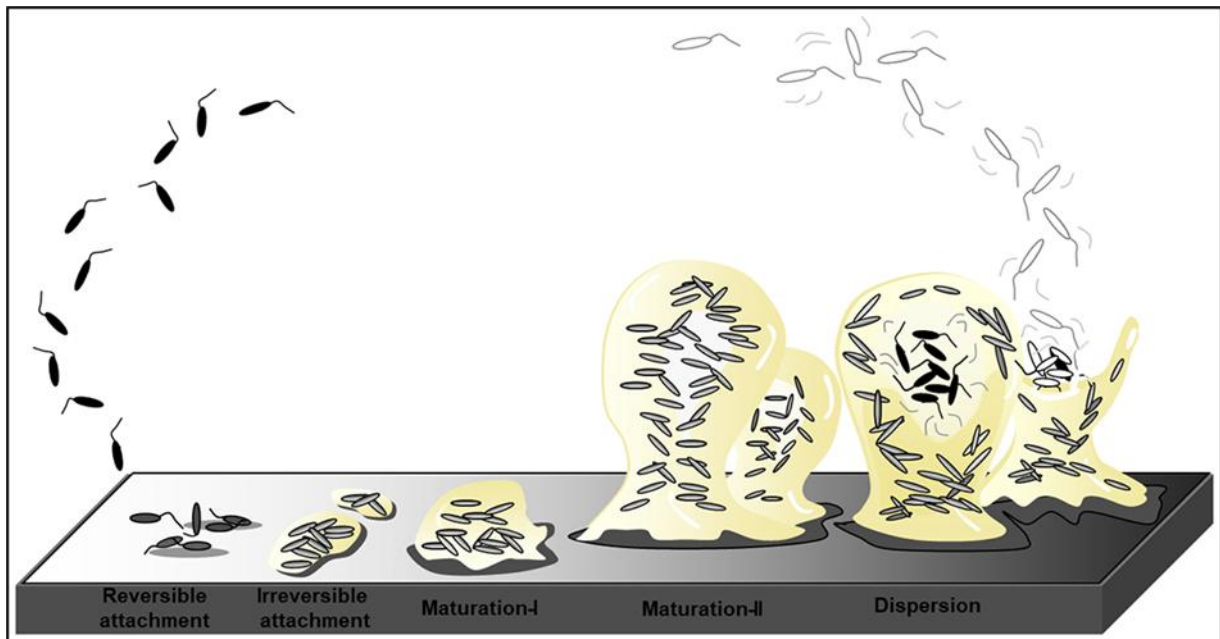


Figure 1.3. Les étapes du développement du biofilm(Sauer et al. 2022).

1.1.3.2. Facteurs sécrétés

1.1.3.2.1. Exotoxine A

L'exotoxine A est l'un des principaux facteurs de virulence de *P. aeruginosa*. Cette protéine appartient au groupe des mono-ADP-ribosyltransférases (Shadman et al., 2021). Elle est responsable de l'inhibition de la synthèse de protéines, ce qui provoque la mort cellulaire et réduit la réaction de l'hôte à l'infection. La machinerie **Sec** ou **Tat** permet d'exporter toutes ces protéines sécrétées à travers la membrane cytoplasmique (Sauvage et Hardouin, 2020).

1.1.3.2.2. Exoenzymes

Au cours de l'infection de l'hôte, *P. aeruginosa* régule positivement le système de sécrétion de type III. Elle sécrète quatre facteurs connus sous les noms Exo U, S, T et Y (Wagener et al. 2020). ExoS possède une capacité à phosphoryler l'ADP chez les protéines eucaryotes (Zago et Chugani 2009). ExoU est une cytotoxine puissante, présente dans les souches cytotoxiques de *P. aeruginosa*. Elle est dotée d'une activité phospholipase A2. ExoY est un facteur d'œdème nucléotidylcyclase qui perturbe l'intégrité de la barrière et provoque un œdème tissulaire. Enfin, ExoT modifie le cytosquelette d'actine (Kaminski et al. 2018).

1.1.3.2.3. Protéase

La protéase alcaline est un facteur de virulence sécrété par le système de sécrétion de type I et contrôlé par le circuit de détection du quorum (Liao et al. 2022). Les protéases sécrétées par *P. aeruginosa* comprennent l'élastase A, l'élastase B, la protéase alcaline (AP), la protéase IV (PIV), la petite protéase de *Pseudomonas* (PASP), la grande protéase A (LepA), (*Pathophysiological aspects of proteases* 2017). LasB permet de cliver l'interleukine 22 (IL-22), une cytokine essentielle au maintien

Chapitre 1 : Revue de la littérature

des défenses innées de la muqueuse contre les agents pathogènes extracellulaires (Bradshaw et al., 2018).

1.1.3.2.4. Phospholipases C

Les phospholipases C (PLC) comprennent un groupe diversifié de protéines qui ont plusieurs effets *in vivo* et *in vitro* (N. Elleboudy, Aboulwafa, et Hassouna 2013). Ces enzymes peuvent participer à la capture du phosphate et à la virulence des isolats producteurs, mais pas à l'autolyse (N. S. Elleboudy, Aboulwafa, et Hassouna 2014).

1.1.3.2.5. Pyocyanine

La pyocyanine joue un rôle important dans la pathogenèse de *P. aeruginosa* et est connue pour avoir des effets inhibiteurs et bactéricides (Nowroozi, Akhavan Sepahi, et Rashnonejad 2012).

1.1.3.2.6. Pyoverdines

Les pyoverdines ont une forte affinité de liaison avec l'ion ferrique (Fe^{3+}), ce qui permet à *P. aeruginosa* de coloniser un large éventail de niches (Chen et al. 2016).

1.1.4. Résistance aux antibiotiques

Les infections à *P. aeruginosa* sont parmi les premières causes de mortalité chez le grand brûlé. Cette gravité est le résultat d'une virulence accrue sur un terrain fragilisé et d'un niveau élevé d'antibiorésistance. L'acquisition de résistances aux β -lactamines tels que les pénicillines/céphalosporines/monobactames, les carbapénèmes, les aminosides et les fluoroquinolones (Barbier et Wolff 2010) chez *P. aeruginosa* entraîne une surproduction de la céphalosporine constitutive, une surexpression des systèmes d'efflux, une diminution active de la perméabilité membranaire et l'acquisition de gènes exogènes (Mérens et al. 2011).

Certaines espèces de *Pseudomonas* ont la capacité de former un biofilm qui les protège contre les antibiotiques. Elles ont une résistance innée à divers antimicrobiens et peuvent développer une résistance lors d'une chimiothérapie anti-pseudomonas. De plus, elles ont la capacité de résister à diverses catégories d'antimicrobiens, notamment à plusieurs médicaments (Poole 2011).

1.2. Cellules lymphoïde innés

1.2.1. Historique

Chapitre 1 : Revue de la littérature

Les cellules lymphoïdes innées (ILC, *InnateLymphoidCells*) sont des effecteurs tissulaires dont la présence dans le corps est vitale, surtout dans la modulation de l'homéostasie immunitaire qui consiste à répondre à une blessure ou une infection et à réparer les tissus endommagés.

Grace à la découverte initiale des ILCs réalisée en 1843 par les chercheurs Andral et Addison, l'immunité innée et les interactions des cellules immunitaires au niveau des sites de barrière épithéliale ont vu une colossale avancée dans la compréhension du mode d'action des leucocytes (Crinier et al. 2017).

Suite à une série de recherches intensives au cours du siècle passé, une définition plus profonde et évoluée a été établie sur le mode de fonctionnement des ILCs. Deux types de populations ont été identifiés. La première population est les cellules natural killer (NK) qui fut mise en évidence en 1975 par les scientifiques Kiessling et ses collaborateurs chez la souris et l'homme. La seconde population est les cellules inductrices lymphocytaires innées (LTi, *innate lymphoid tissue inducer cells*) découverte dans les années 2000 (Shin et McNagny 2021). L'étude faite par ces chercheurs a montré que les NK sont semblables aux lymphocytes T cytotoxiques (CTL) mais possèdent la capacité à éliminer les cellules cibles en les détectant différemment vu le manque de récepteurs de lymphocytes T, TCR.

Pendant longtemps, ces cellules NK et LTi sont restées les seuls types des ILCs connus, mais au fil des années (entre 2008 et 2011), d'autres recherches parus ont montré l'existence d'autres types de cellules, tels que NK22, ROR (*retinoic acid receptor tyrelated orphan receptor*), NKp46+, NKLTi, nuocytes ou encore natural helper cells (Narni-Mancinelli et al., 2011). Tous ces types ont été classés selon leurs caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles, en 3 grandes familles (uniformisation en 2013 par Spitz et al.):

- Les ILC de type 1 (dont font partie les cellules NK),
- Les ILC de type 2,
- Et les ILC de type 3 (dont font partie les LTi).

1.2.2. Développement

Les ILC sont des cellules effectrices qui assurent la défense contre les infections. Ces cellules se développent dans la moelle osseuse et ont été définies par un ensemble de facteurs de transcription, d'antigènes de surface et de cytokines (Shin et McNagny 2021b). Les ILCs constituent une famille de cellules lymphoïdes homologues « innées » des lymphocytes T. Contrairement aux cellules immunitaires adaptatives, les ILCs n'ont pas de récepteurs réarrangés spécifiques de l'antigène, mais réagissent rapidement à un large éventail de signaux innés. Cela veut dire que ces cellules peuvent se développer en absence de niche thymique (figure 1.4) (Van De Pavert 2021).

Tout d'abord, le progéniteur lymphoïde commun (CLP pour common lymphoid progenitor) se distingue par l'expression de la sous-unité du récepteur de l'IL-7 (CD127), du proto-oncogène, c-Kit

Chapitre 1 : Revue de la littérature

(CD117) et du récepteur de tyrosines kinases Flt3 (Fms-like tyrosine kinase 3). Ces deux populations ont perdu la capacité de se différencier en lymphocytes adaptatifs:

- les EILP (*early innate lymphoid progenitors*), ont récemment été identifiés dans la moelle osseuse de souris adultes en tant que population de progéniteurs multipotentiels spécifiés vers les lignées de cellules lymphoïdes innées (Harly et al. 2018) qui expriment l'IL-7R α (Harly et al. 2018b).
- les CILP (*common innate lymphoid precursors*) se distinguent de leurs précurseurs par l'absence d'expression de Flt3 et la présence à leur membrane de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ et du récepteur de chimiokine CXCR6 (*C-X-C motif chemokine receptor 6*) (Cypowyj et Vivier 2016).

Le CHILP est caractérisé par un phénotype de surface similaire à celui du CLP, avec l'expression de l'IL-7R α , mais sans CD93 et Flt3 (Klose et Artis 2020). De plus, il présente l'expression du répresseur transcriptionnel ID2, qui joue un rôle crucial dans la production d'organes lymphoïdes périphériques et de cellules (Yokota et al. 1999). Les progéniteurs PLZF, un gène qui a été précédemment lié au développement des lymphocytes T et NK, des niveaux élevés d'ID2 et de GATA3 étaient également observés dans les précurseurs du PLZF (codé par *Zbtb16*), ce qui favorise l'acquisition de fonctions effectrices innées dans les cellules T tueuses naturelles (NKT), ce qui modifie le développement de plusieurs sous-ensembles d'ILC, mais pas dans les cellules LTi ou NK (Bordon 2014).

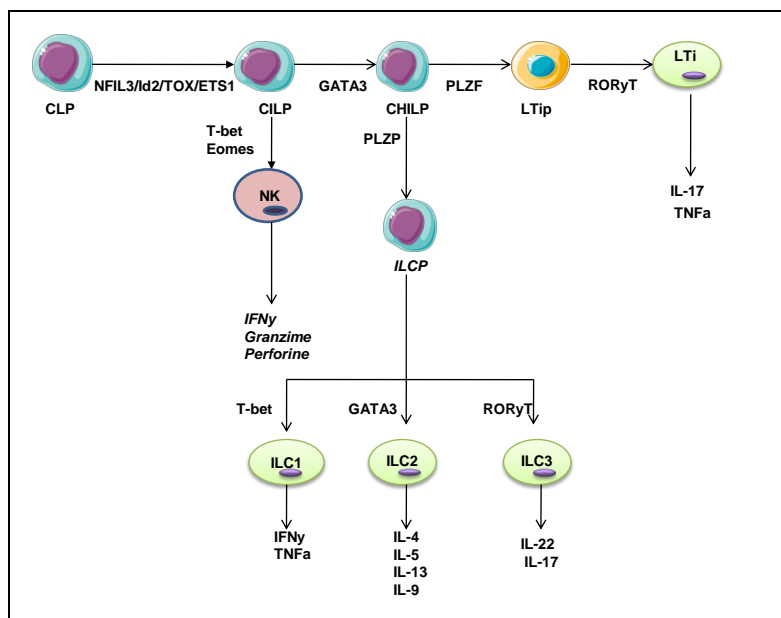


Figure 1.4. Développement des cellules lymphoïdes innées (Borger, Lau, et Hibbs 2019). Les ILC se développent à partir des CILP (common innatelymphoid progenitor), qui elles-mêmes se différencient à partir des CLP (commonlymphoid progenitor). Les CILP peuvent se différencier en précurseurs de cellules NK (NKP) ou en CHILP (common helper innatelymphoid progenitor), qui elles-mêmes donneront les LTiP (lymphoid tissue inducer progenitor) et les ILCP (innatelymphoid cell precursor). Les LTiP se différencient en LTi, et les ILCP en ILC1, ILC2 ou ILC3. Chaque étape de différenciation est dépendante de l'expression des facteurs de transcription indiqués: NFIL3 (nuclear factor il-3 induced), Id2 (inhibitor of dna binding 2), TOX (thymocyte selection-associated high mobility group box protein), TCF-1 (T cell factor

Chapitre 1 : Revue de la littérature

1), ETS1 (avianerythroblastosis virus E26 homolog-1), GATA3 (GATA binding protein 3), PLZF (promyelocytic leukaemia zinc finger), T-bet (T-box transcription factor), Eomes (Eomesodermin), et de la variété unique de cytokines qu'elles produisent et de la variété unique de cytokines qu'elles produisent. Cela établit les rôles distincts qu'ils jouent dans les réponses immunitaires et le développement des organes lymphoïdes.

1.2.3. Sous populations

Les ILCs sont un groupe hétérogène de cellules immunitaires classées principalement en trois groupes en se basant sur l'expression de facteurs de transcription et la capacité à produire des cytokines effectrices (Stosik, Tokarz-Deptuła, et Deptuła 2024).

1.2.3.1. ILC de type 1

Le premier groupe comprend les ILC1s et les cellules NK qui sont dépendantes du facteur de transcription T-bet. Suite à leur activation par l'IL-12, l'IL-15 et l'IL-18, ces cellules produisent l'IFN- γ (Stosik, Tokarz-Deptuła, et Deptuła 2024). Les ILCs de type 1 participent aux réponses immunitaires fonctionnelles contre les virus et les bactéries par la sécrétion des cytokines de type Th1, tels que l'IFN- γ et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) (Jan-Abu, Kabil, et McNagny 2023). Les cellules NK se retrouvent dans les tissus lymphoïdes et circulent dans le sang. Les autres populations d'ILC1 se retrouvent en général au niveau des barrières épithéliales muqueuses, telles que les muqueuses intestinales, pulmonaires et glandulaires.

Les cellules NK se caractérisent par leurs propriétés cytotoxiques contre les cellules tumorales ou infectées *via* la ligne germinale codée des récepteurs immunitaires tels que NKG2D (natural killer group 2 member D) et NKP46 (cellules NK exprimant le marqueur NKp46 à leur surface) (S. Duan et al. 2019).

1.2.3.2. ILC de type 2

Les cellules ILC2s et les ILC régulateurs (ILCreg) sont des ILC de type 2. La croissance des cellules ILC2 est principalement influencée par le facteur de transcription GATA-3. Leur particularité réside également dans leur dépendance au facteur ROR α (RAR-related orphan receptor α) qui régule leur développement et leurs fonctions, ce qui leur permet de produire des cytokines comme l'interleukine IL-13, IL-5 et IL-4, IL-9 (Sophie Cypowyj).

1.2.3.2. A. ILC2

Les ILC2s cellules dépendent des facteurs de transcription ROR α et produisent les cytokines de type 2, telles que l'IL-5 et l'IL-13 suite à leur stimulation par l'IL-25. Ces cellules se caractérisent par l'expression de l'IL-33R et participent dans la réponse immunitaire contre les parasites. Les ILC2 intestinales expriment l'IL-25R et les ILC2 cutanés expriment l'IL-18R (Crinier et al. 2017).

1.2.3.2. B. ILCreg

Chapitre 1 : Revue de la littérature

Lors d'une inflammation, ces cellules secrètent l'IL-10 et interviennent dans les réponses immunitaires intestinales (Stosik, Tokarz-Deptuła, et Deptuła 2024).

1.2.3.3. ILC de type 3

Les ILCs de type 3 comprennent les cellules ILC3 et LTi. Ces cellules sont définies comme des cellules qui dépendent du facteur de transcription ROR γ t et qui secrètent l'IL-17 et d'IL-22 pour favoriser l'inflammation intestinale et le maintien de la tumeur (Jan-Abu, Kabil, et McNagny 2023). Elles jouent un rôle clé dans l'homéostasie intestinale, les réponses antibactériennes, l'inflammation chronique, le remodelage et la réparation grâce à la production d'IL-1 (Gronke, Kofoed-Nielsen, et Diefenbach 2016).

1.2.4. Plasticité

Les ILC peuvent subir une plasticité en d'autres sous-ensembles d'ILC en réponse à des agents pathogènes (Korchagina et al. 2023) tels que les signaux environnementaux et plusieurs facteurs extrinsèques et intrinsèques de la plasticité (figure 1.5) (Pelletier et Stockmann 2022). La plasticité des ILCs a été observée *in vitro* et *in vivo* chez la souris et l'homme (Juelke et Romagnani 2016) et elle a été montrée en 1985 par le scientifique Helen Blau qui a désigné la capacité d'une cellule à changer d'identité (Bal, Golebski, et Spits 2020).

Les ILC1 peuvent être générées à partir de la conversion des ILC2, qui régulent négativement GATA-3 et régulent positivement T-bet en présence d'IL-1 β , d'IL-12 et d'IL-33 ou de la conversion des ILC3, qui régulent négativement ROR γ t et régulent positivement T-bet en présence d'IL-12 et d'IL-18. À l'inverse, les ILC1 peuvent être converties en ILC3 en présence d'IL-2, d'IL-23, d'IL-1 β et d'acide rétinoïque (RA) (Crinier, Vivier, et Bléry 2019).

Le sous-ensemble ILC3 : NCR-ILC3 peut se différencier en NCR+ ILC3 sous l'influence de T-bet. Cette voie semble être augmentée par l'IL-2, l'IL-1 β , l'IL-23 et l'IL-12 tandis que le TGF- β agit comme inhibiteur de le développement de NCR + ILC3 et conduit potentiellement à la réversion des cellules (Almeida et Belz 2016).

La conversion des cellules NK en ILC1 est induite par l'IL-12 et le TGF- β qui entraîne une régulation positive de T-bet et une régulation négative d'Eomes. La plasticité de l'ILC3 en ILC1 est médiée par l'IL-12 et l'IL-1 β qui conduisent à une régulation négative de ROR γ t et à une régulation positive de T-bet. À l'inverse, la conversion ILC1 \rightarrow ILC3 est induite par l'IL-23, l'IL-1 β et l'acide rétinoïque (RA), ce qui conduit à une régulation positive de ROR γ t et à une régulation négative de T-bet. Les facteurs de transcription Zbtb46 stabilisent davantage la lignée ILC3. De la même façon que la transition ILC3 \rightarrow ILC1, la plasticité ILC2 \rightarrow ILC1 est modulée par l'IL-12 et l'IL-1 β , ce qui entraîne une régulation négative de GATA3 et une régulation positive de T-bet. Par contre, l'IL-4 est responsable de la plasticité inversée ILC1 \rightarrow ILC2. De plus, la sécrétion d'IL-1 β , d'IL-23 et de TGF- β a un impact sur la plasticité entre ILC2 et ILC3.

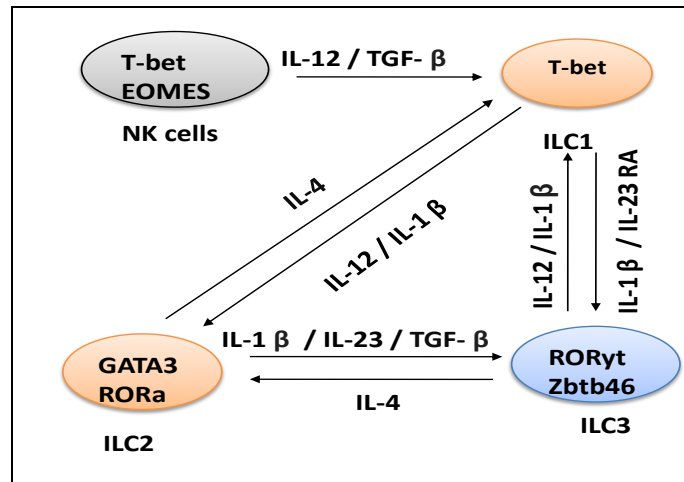


Figure 1.5. Plasticité des ILC (Korchagina, Koroleva, et Tumanov 2023).

1.2.5. Fonctions des ILCs

Les ILCs sont des cellules immunitaires qui ne possèdent pas de récepteur antigénique spécifique, mais qui peuvent générer un ensemble de cytokines effectrices dont la composition est similaire à celle des sous-ensembles de cellules T auxiliaires. Les ILC jouent un rôle essentiel dans la formation des lymphocytes, le renouvellement des tissus, l'immunité antimicrobienne et l'inflammation, notamment au niveau des surfaces de protection. Il est fort probable que les ILC jouent un rôle essentiel dans les défenses immunologiques de première ligne en répondant rapidement aux insultes infligées par des microbes responsables du stress (Spits et Cupedo 2012).

1.2.5.1. ILC1s

Les ILC1 sont des cellules lymphoïdes innées de type 1 (ILC1) qui vivent dans les tissus et qui produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que IFN-γ et TNF-α, ainsi que des médiateurs cytotoxiques tels que les granzymes. Ces médiateurs permettent à ces cellules de développer des réponses immunitaires et de tuer directement les cellules cibles (Taggenbrock et van Gisbergen 2023). Grâce à la libération de l'IFN-γ, les ILC1s renforcent la réponse immunitaire antimicrobienne et contribuent à l'élimination de l'agent pathogène. D'autre part, les ILC1 intraépithéliaux murins ont la capacité de réagir rapidement après une infection. Dans le modèle de colite causée par les anti-CD40, l'IFN-γ a joué un rôle dans l'inflammation intestinale (Fuchs et al. 2013).

1.2.5.2. ILC2s

Chapitre 1 : Revue de la littérature

Les cytokines comme l'IL-5 et l'IL-13 sont produites par les ILC2, qui jouent un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire contre les parasites et les bactéries (McKenzie 2014). Les ILC2 immatures et matures cultivés dans des milieux contenant de l'IL-7 et de l'IL-2 associés à de l'IL-33 ou de l'IL-25 ont démontré une régulation positive de GATA3 et de KLRG1 (respectivement), une sécrétion d'IL-5 et d'IL-13 et une prolifération (Herbert, Douglas, et Zullo 2019).

1.2.5.3. ILC3s

Les ILC3 sont impliqués dans la régulation de la réponse immunitaire dans les muqueuses, notamment dans la protection contre les infections bactériennes et fongiques. Ils produisent des cytokines telles que l'IL-17 et l'IL-22, qui contribuent à renforcer la barrière épithéliale et à réguler l'équilibre entre les bonnes et les mauvaises bactéries dans le système digestif. Les ILC3 sont donc importants pour maintenir l'homéostasie et la protection contre les infections dans les muqueuses. De plus, les ILC3 sécrètent l'IL-22 au récepteur hétérodimère IL-22R α 1 – IL-10R β sur l'épithélium cellulaire, qui assure la médiation de la résistance aux bactéries intestinales (Klose et Artis 2016).

1.3. Protéine Eomesodermin

1.3.1. Définition

Eomesodermin (Eomes) est une protéine connue sous le nom de T-box brain 2 (TBR2) hautement homologue à T-bet (Zhang et al. 2018a). Elle fait partie de la famille phylogénétiquement et qui est exprimée par les cellules NK et lymphocytes T(LT) (Knox et al. 2014), liée à des facteurs de transcription de la famille T-box (Willmer et al. 2017). Elle est impliquée dans la régulation de l'immunité de type 1 et la différenciation (Zhang et al. 2018a) et permet le maintien des cellules NK à l'état mature (Gordon et al. 2012).

La famille T-box est définie comme la région minimale de la protéine qui est à la fois nécessaire et suffisante pour la liaison à l'ADN spécifique à une séquence contenant environ 180 à 200 acides aminés. Elle se divise en cinq sous-groupes TBX1, TBX2, TBX6, TBX5 et TBR1 qui sont exprimés dans le cœur embryonnaire chez l'homme et les modèles vertébrés conservés car ils sont importants pendant l'embryogenèse et le développement et sont conservés au cours de l'évolution (figure 1.6) (Zhu et al. 2017).

Chapitre 1 : Revue de la littérature

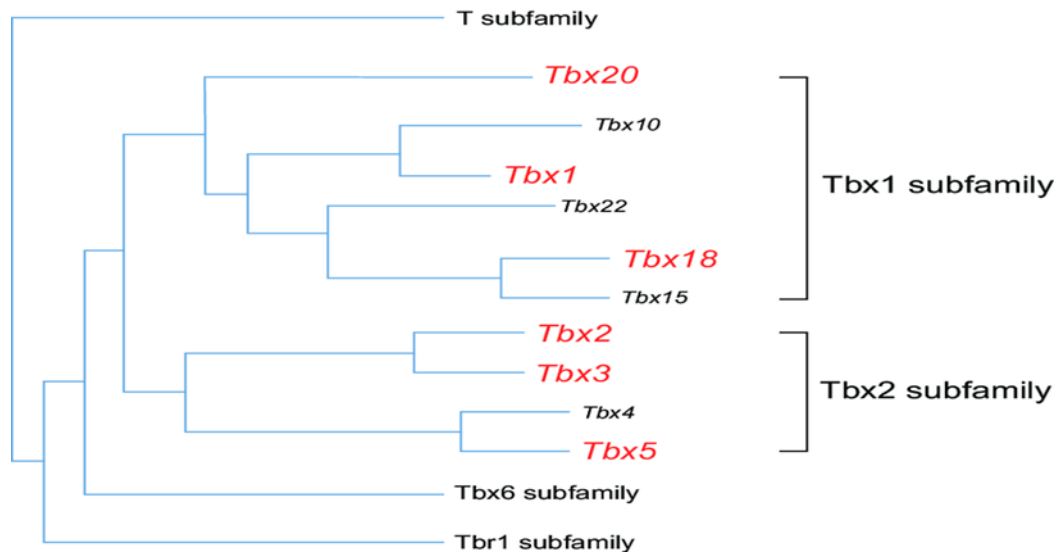


Figure 1.6 L'arbre phylogénétique schématisé de la famille des gènes T-box (Zhang et al. 2018). Six gènes de la boîte T exprimés dans le cœur sont représentés en rouge. Ces six gènes sont inclus dans la sous-famille Tbx1 ou Tbx2

1.3.2. Gène *Eomesodermin*

Le gène *Eomesodermin*, membre de la famille Tbx1 (Sheeba et Logan 2017), est situé sur le chromosome 9 chez la souris et sur le chromosome 3 chez l'homme (figure 1.7), dont les régions génomiques ont été découvertes des travaux du John Gurdon sur *Xenopus laevis*.

Le gène *Eomesodermin* a été reconnu comme l'un des premiers gènes exprimés après le début de la transcription du gène zygotique dans les cellules caractéristiques du mésoderme. (Probst et Arnold 2017).

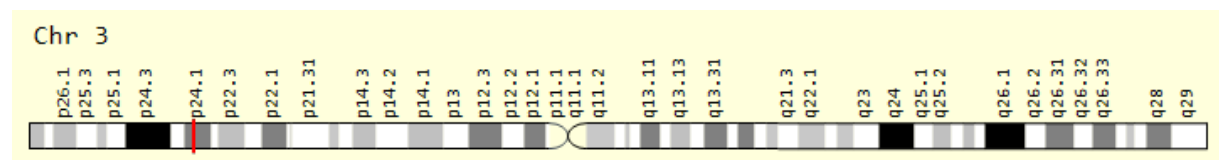


Figure 1.7. Localisation du gène *eomes* (NCBI).

1.3.3. Rôle de la protéine Eomes dans ILC

Eomes est une protéine du système immunitaire qui joue rôle de facteur de transcription permettant de réguler l'immunité de type 1 et la différenciation des cellules NK. Elle favorise la maturation précoce des cellules NK (Zhang et al. 2018a), ce qui entraîne une augmentation de l'expression des récepteurs NK et une amélioration de l'expression de CD16 (Kiekens et al. 2021). Pendant la maturation des cellules NK, l'expression de T-bet est régulée de manière négative, tandis que l'expression de T-bet est régulée de manière positive (figure 1.8). En outre, *Eomes* pourrait jouer un rôle crucial dans la stimulation de la prolifération des cellules NK en inhibant le CD122 (Zhang et al. 2018b).

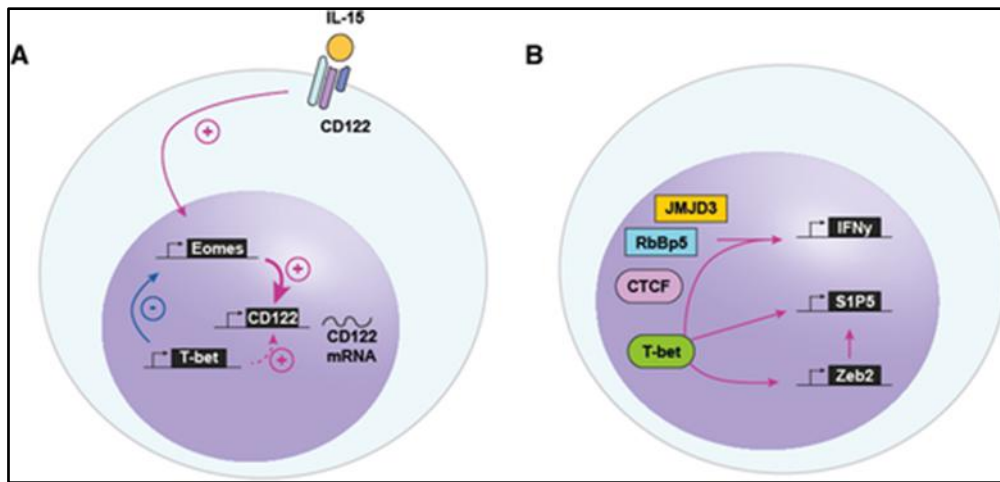


Figure 1.8. Mécanismes de régulation T-bet et Eomes. (Zhang et al. 2018b) Dans ce modèle, T-BET et EOMES seraient capables de se lier au promoteur *Il2rb* et de favoriser la transcription, mais EOMES serait plus puissant que T-BET. Comme les deux TF seraient en compétition pour le même site, la quantité relative de chaque TF déterminerait le niveau d'expression de CD122. De plus, l'expression de CD122 aurait un retour positif sur sa propre expression en induisant l'expression d'Eomes. La régulation de l'expression d'IFN γ et de S1P5 par T-bet dans les cellules NK et les cellules T CD8+. IFN γ et S1P5 sont tous deux régulés par T-bet. Dans les cellules T, il a été démontré que l'expression de l'IFN γ est activée en favorisant le remodelage de la chromatine.

1.4. Réaction de polymérisation en chaîne

1.4.1. Définition

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR, *Polymerase-Chain-Reaction*) telle que définie dans l'Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, est un outil puissant de biologie moléculaire depuis le milieu des années 1980 (McKinzie et Myers 2023). La PCR est une technique d'amplification d'acide nucléique en laboratoire utilisée pour dénaturer et renaturer de courts segments de séquences d'acide désoxyribonucléique (ADN) ou d'acide ribonucléique (ARN) à l'aide de l'enzyme ADN polymérase (Khehra, Padda, et Swift 2024). Cette technique repose sur l'utilisation de courts oligonucléotides synthétiques complémentaires aux régions terminales de la séquence d'ADN à amplifier (Karunanathie et al. 2022).

1.4.2. Principe

La PCR consiste en une succession de réactions de réplication d'une matrice double brin d'ADN. Chaque réaction met en œuvre deux amorces (Jaton et Greub 2007) qui sont les principaux déterminants de sa spécificité, de sa sensibilité et de sa robustesse (Biassoni et Raso 2020). La PCR est une méthode itérative composée de cycles successifs, chacun comportant trois étapes de température distinctes. En général, une PCR implique entre 20 et 40 cycles en moyenne (Larzul 1989). La réaction PCR est réalisée par cyclage thermique en présence d'oligonucléotides spécifiques, de l'enzyme polymérase, des acides nucléiques libres et des sels bivalents tels que MgSO₄ ou MgCl₂ (Ahrberg et al. 2016).

Chapitre 1 : Revue de la littérature

1.4.3. Acteurs de la PCR

1.4.3.1. ADN polymérase

L'ADN polymérase joue un rôle essentiel dans la réplication de l'ADN et la PCR. Sa fonction principale consiste à stimuler la formation de liaisons phosphodiester entre les nucléotides complémentaires, ce qui permet la création de nouveaux brins d'ADN (Lamoril et al. 2007).

1.4.3.2. Les amorces

Ces sont des oligonucléotides placés à l'intérieur de la première paire d'amorces. Chaque amorce doit avoir 20 – 30 de longueur et doit contenir un nombre à peu près égal des quatre bases, avec un équilibre de distribution des résidus G et C. Les sites de restriction peuvent être ajoutés aux extrémités 5' des amorces pour faciliter le clonage et la manipulation ultérieure du produit amplifié (Green et Sambrook 2019).

1.4.3.3. Les nucléotides dNTPs

Les quatre désoxynucléotides triphosphates, dGTP, dATP, dCTP et dTTP, seront assemblés par la Taq-polymérase pour former le brin d'ADN complémentaire (Mohsen, Ji, et Kool 2019).

1.4.3.4. Ion du magnésium (Mg⁺⁺)

Ce cation est un cofacteur indispensable au bon fonctionnement de la polymérase et à l'incorporation des précurseurs. Il doit être fourni en concentration précise sous forme de MgCl₂ (Seemayer, 1990).

1.4.4. Etapes

La figure 1.9 représente les étapes de la PCR.

1.4.4.1. Dénaturation

Durant cette étape, le milieu réactionnel est porté à une température élevée, environ 94°C. Les liaisons hydrogène ne peuvent être maintenues à une température supérieure à 80°C et les deux brins d'ADN sont rompues, provoquant la dénaturation de l'ADN double brin en brins simples (Kadri 2020).

1.4.4.2. Hybridation

Dans cette étape, deux amorces d'ADN d'environ 20 bases s'hybrident de façon spécifique grâce à la complémentarité des bases, sur un brin d'ADN ou son complémentaire. Cette étape est réalisée à une température dépendante de la composition en bases puriques et pyrimidiques de ces amorces, en général entre 45 °C et 65 °C (Vassias 2012).

1.4.4.3. Extension

L'ADN polymérase (Taq polymérase) est une enzyme qui capte les nucléotides à la chaleur et étend l'ADN brin de la direction 3' à 5'. La répétition de ce cycle thermique pendant 25 à 30 fois augmente le produit ADN (Dey 2018). Pendant cette phase, la température est rapidement augmentée jusqu'à environ 72°C, la température optimale de polymérisation de la Taq polymérase. Cette enzyme

Chapitre 1 : Revue de la littérature

ADN-dépendante synthétise un brin complémentaire à partir des deux amorces hybrides en lisant la séquence du brin matriciel(Ahrberg et al . ,2016).

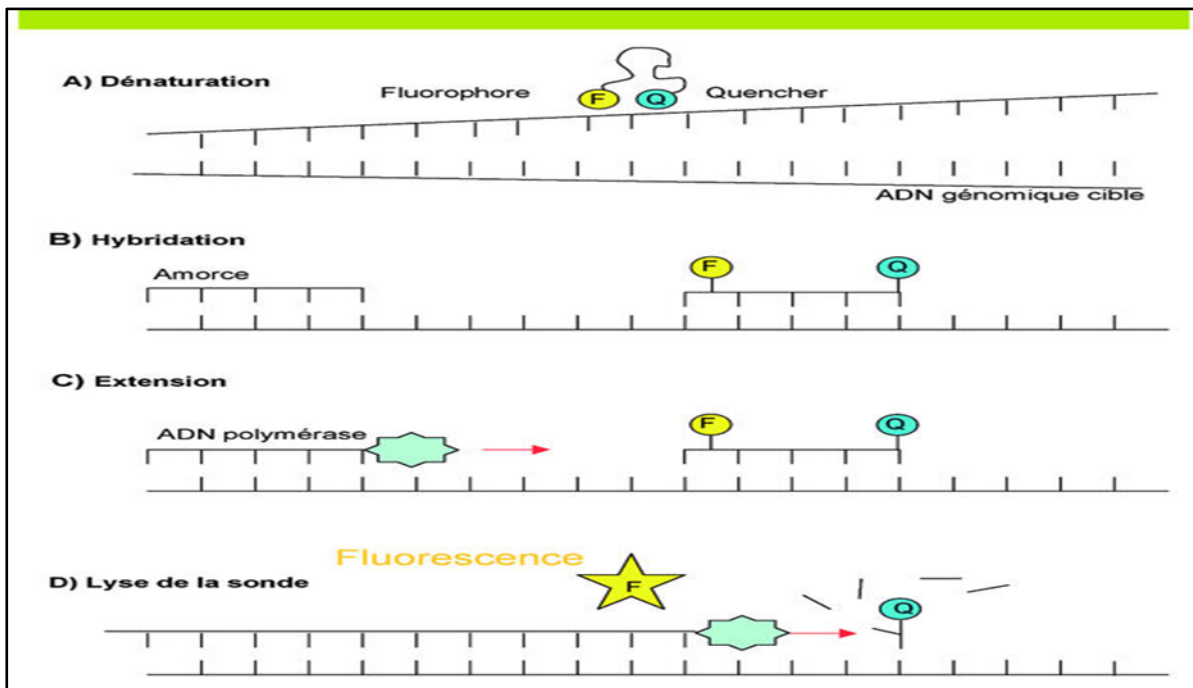


Figure 1.9. Les étapes de la PCR (Jaton et Greub 2007). Les étapes de la PCR (Polymerase Chain Reaction) comprennent généralement la dénaturation, l'hybridation et l'extension. La première étape consiste à chauffer l'échantillon à une température élevée (environ 95°C) pour séparer les brins d'ADN en deux brins complémentaires. Ensuite, la température est abaissée pour permettre aux amorces (primers) de se lier spécifiquement aux séquences d'ADN cible. Extension: À une température optimale, l'ADN polymérase synthétise de nouveaux brins d'ADN complémentaires à partir des amorces liées, en allongeant la séquence cible.

1.4.5. Avantages de la PCR

Les avantages de la PCR sont nombreux :

- **Sensibilité :** la PCR est une technique hautement sensible, capable de détecter et d'amplifier une très faible quantité d'acide nucléique, même à partir de quelques copies de la séquence cible. Cela en fait un outil puissant pour la détection des cibles moléculaires, même à des niveaux très faibles (Solanki, 2012).
- **Rapidité :** la PCR offre un important gain de temps par rapport à d'autres techniques telles que la culture cellulaire. En éliminant les étapes de culture et d'incubation nécessaires dans d'autres méthodes. La PCR permet d'obtenir des résultats en un temps beaucoup plus court (Wang and Cheng, 2018).
- **Spécificité :** la PCR est également très spécifique. Les amorces d'ADN utilisées sont conçues pour se lier spécifiquement à la séquence cible, ce qui réduit les risques de réactions croisées ou non spécifiques. Cela permet une identification précise et fiable de la séquence d'intérêt, même en présence d'autres séquences d'ADN (Jiang et al., 2018).

Chapitre 1 : Revue de la littérature

1.5. Problématique et objectif

1.5.1. Problématique

Les ILCs jouent un rôle crucial dans la régulation de l'inflammation et la lutte contre les agents pathogènes. Les ILCs du groupe 1 (ILC1s) associées à une réponse proche de celle de TH1 se caractérisent par la production des cytokines pro-inflammatoires et anti-tumorales telles que l'IFN- γ et le TNF. De plus, les cellules NK, sous type des ILC1s expriment le facteur de transcription Eomes qui est responsable de leur formation et leur fonctionnement. L'étude de son expression par les ILCs permet de caractériser les sous populations intervenant dans l'élimination des infections bactériennes notamment celles causées par *P. aeruginosa*.

1.5.2. Objectif

Ce travail vise à élaborer des séquences d'oligonucléotides qui seront utilisées comme amorces pour amplifier le gène *Eomesodermin* par PCR.

1.5.3. But

Le but de ce travail est de concevoir des amorces spécifiques pour le gène *Eomesodermin* afin déterminer son taux au niveau des ILC1s lors d'une infection bactérienne par *P. aeruginosa*.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Chapitre 2. Matériel et méthodes

2.1. Conception des amorces

Le processus de conception des amorces pour la PCR consiste à générer des séquences courtes d'ADN complémentaires pour la région spécifique que l'on souhaite amplifier (Tang 2013). Ces amorces doivent être orientées dans le bon sens 5'→3' et être parfaitement complémentaires au brin d'ADN cible (Pasicet., 2014 ; Bhat and Rao, 2020). Ce processus nécessite la prise en considération de divers paramètres afin de garantir une bonne amplification lors de la réaction en chaîne par polymérase (Elkins 2015). Ces paramètres inclus :

- **La longueur de l'amorce**

La longueur des amorces fait référence au nombre de nucléotides qui composent l'amorce. Une longueur optimale, généralement entre 15 et 35 nucléotides, est cruciale pour assurer une spécificité adéquate lors de l'amplification. Une amorce courte peut entraîner une faible spécificité, tandis que l'amorce longue peut avoir un impact sur l'efficacité de l'hybridation avec la séquence cible (Lorenz 2012).

- **La teneur en G/C**

La teneur optimale en GC d'une amorce se situe entre 40 et 60 (Ozturk et Can 2017).

- **La température de fusion (T_f)**

Pour un résultat fiable, la température de fusion doit être comprise entre 55 et 75° C (Higgins et al., 2019).

- **La spécificité d'une amorce**

La spécificité d'une amorce en PCR, dépend au moins partiellement de la longueur de l'amorce qui fait référence à sa capacité à se lier de manière précise et exclusive à la séquence d'ADN cible. Une amorce spécifique ne doit se lier qu'à la région spécifique de l'ADN que l'on souhaite amplifier, évitant ainsi toute amplification non spécifique (Joshi et Deshpande 2011).

- **La séquence à l'extrémité**

Les extrémités des séquences sont des régions spécifiques à chaque extrémité d'un fragment d'ADN que les amorces se lient pendant le processus d'amplification. C'est un élément clé du processus de PCR pour amplifier spécifiquement la région d'intérêt.

2.2. Conception de la séquence du gène *EOMES*

2.2.1. Recherche de la séquence du gène *EOMES*

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

La conception des amorces encadrant le gène *Eomes* commence par la recherche de la séquence de référence du gène *Eomes*, dans une base des données de génomes. Dans mon travail, j'ai utilisé la base de données Ensembl (www.ensembl.org) (Figure 2.1, 2.2 et 2.3).

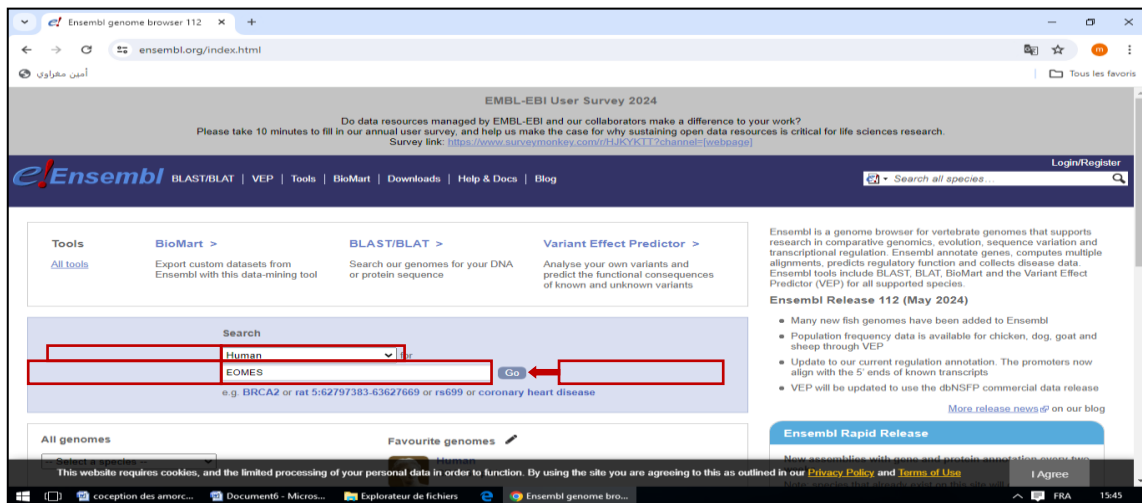


Figure 2.1. Plateforme de la base de données Ensembl.(1) Spécifier l'espèce Humain puis (2) inscrire le nom du gène *EOMES* ensuite (3) cliquer sur GO pour afficher le résultat (encadrer en rouge).

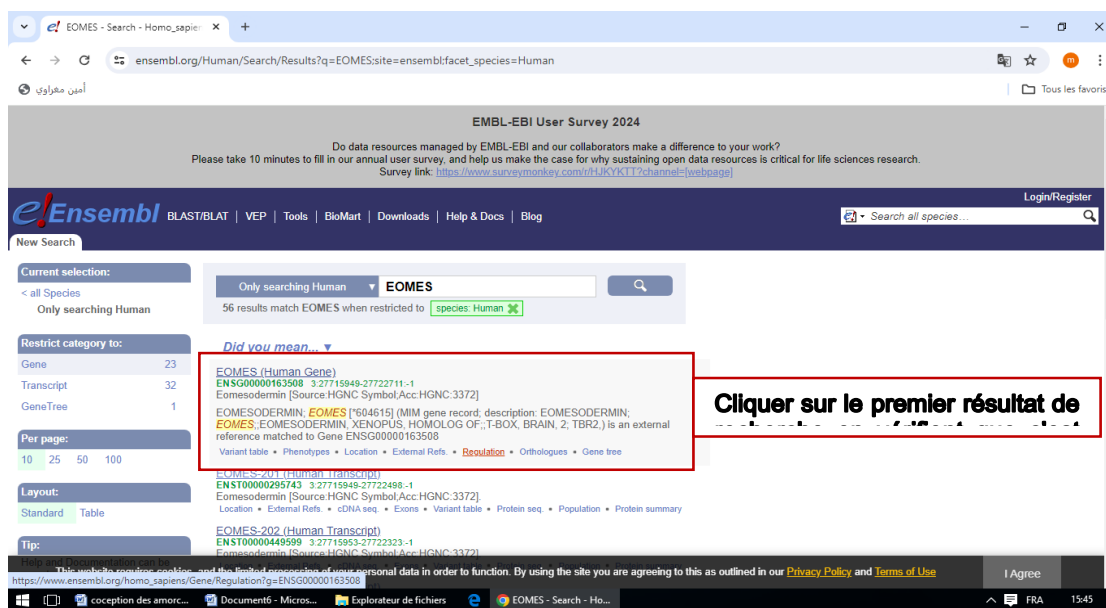


Figure 2.2. Résultat de la recherche du gène *Eomes*. Cliquer sur le premier résultat de recherche en vérifiant que c'est bien le gène désiré et qui correspond à l'espèce humaine (encadrer en rouge).

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

The screenshot shows the Ensembl browser interface for the gene EOMES. The left sidebar contains a navigation menu with 'Sequence' highlighted in red. The main content area displays the gene's name, description, location, and a table of transcripts. The table has columns for Transcript ID, Name, bp, Protein, Biotype, CCDS, UniProt Match, RefSeq Match, and Flags. Below the table is a 'Summary' section with fields for Name, MANE, UniProtKB, and RefSeq.

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

La séquence de gène *Eomes* est présentée dans la figure 2.4.

The screenshot shows the DNA sequence of the EOMES gene. The sequence is displayed in black (introns) and red (exons). A red box highlights a specific region of the sequence. A red box with the text 'Sélectionner une partie de la séquence' is overlaid on the highlighted region. The sequence starts with 'TCTTGAGCTTCAACATAAAGCGACTCAATCCCACTGCCACTACAATGTGTCTGAGAGG' and ends with 'AGTTTTCACCCGACAGCCAGTGTGTTTTTCCATTCACATTGACAAAGAGGTTTGATCTG'.

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

Pour rechercher 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).

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

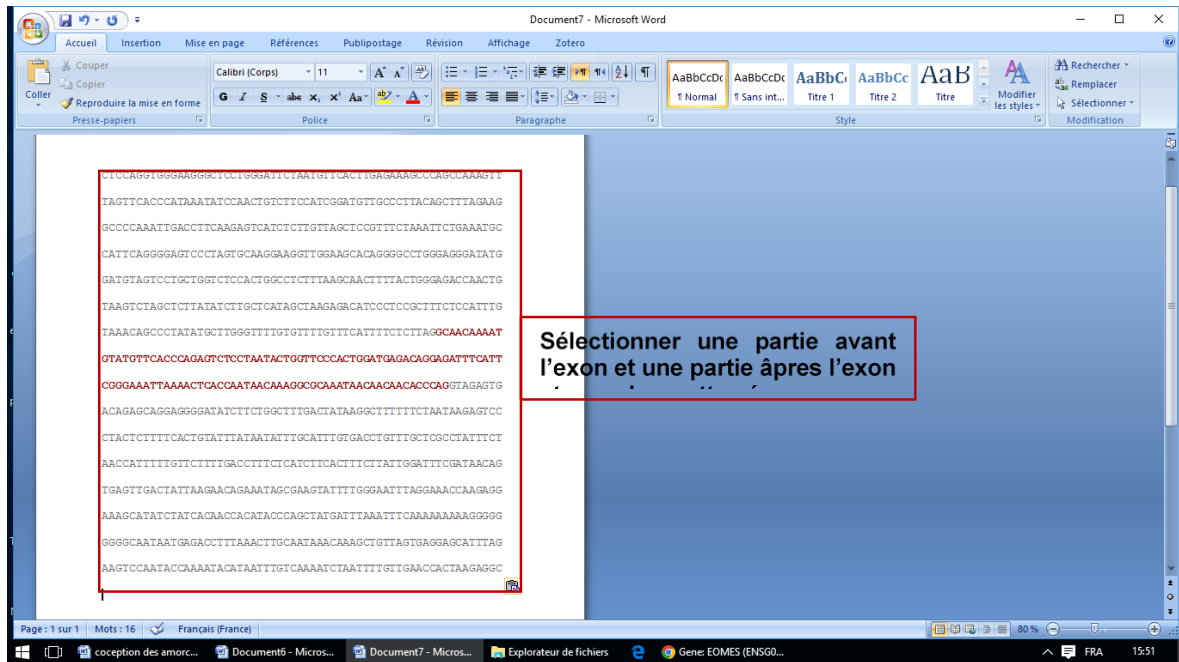


Figure 2.5. La séquence d'intérêt.

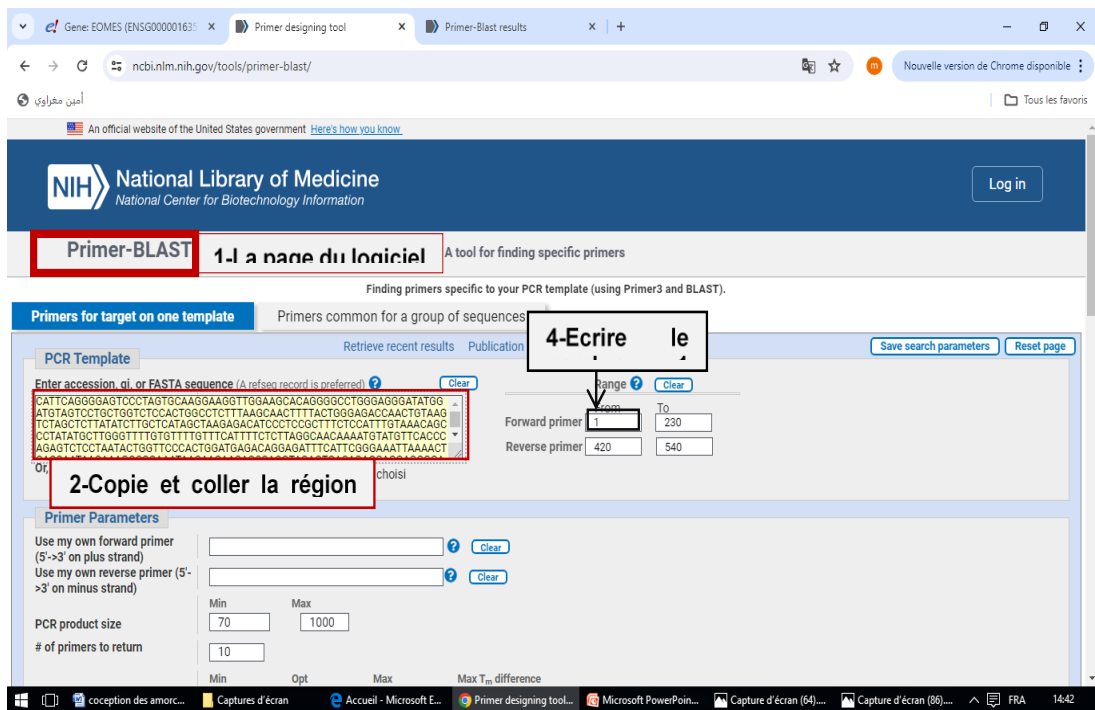


Figure 2.6. L'outil Primer – Blast. (1) La page du logiciel s'affichera comme dans la figure dessus, ensuite (2) copier la région d'intérêt encadrer du document Word et la coller dans la case « Entrer accession, gi or FASSTA » (encadrer en rouge), puis (3) supprimer les espaces entre les lignes, on détermine les amorces sens et anti sens.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

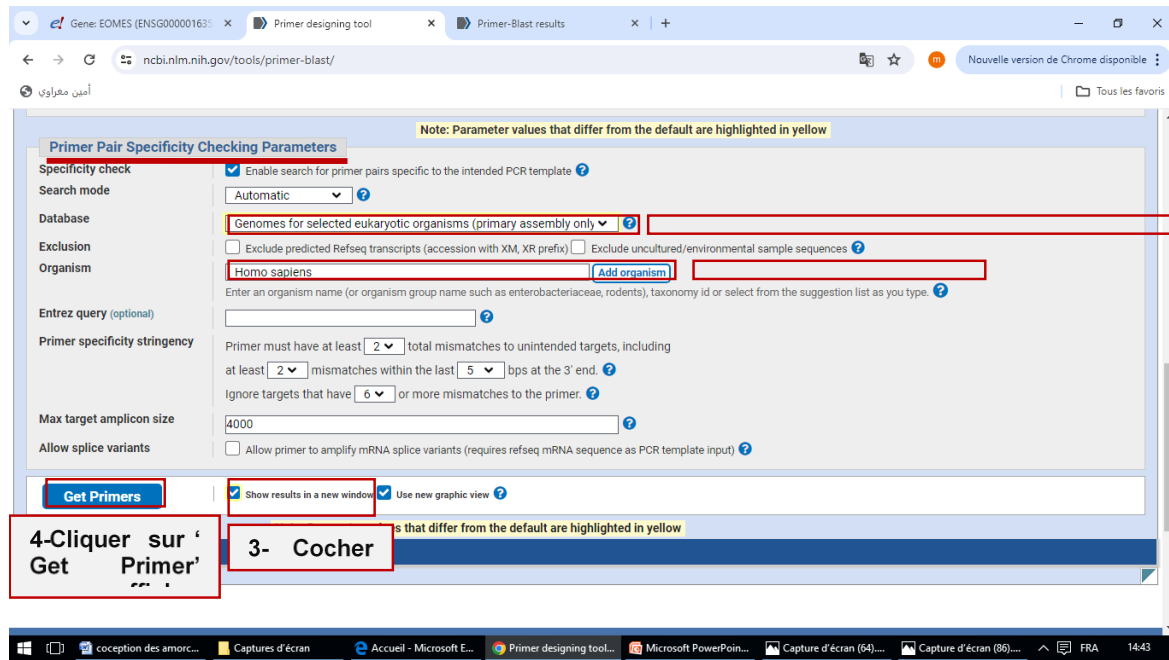


Figure 2.7. Paramètre de vérification de la spécificité de la paire d'amorces (Primer Pair Specificity Checking Parameters). Faites défiler la page en bas, puis (1) sélectionner la case où c'est écrit « RefSeqmRNA » et choisir « Genomes for selected organisms », (2) vérifier l'espèce que c'est bien « Homo sapiens », (3) cocher la case « Show results in new window » pour que les résultats s'affichent dans une nouvelle fenêtre et après (4) cliquer sur « Get Primer » pour afficher les résultats.

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

Une analyse de confirmation de la paire d'amorce qu'on a choisie a été effectuée par *in-silico* PCR (PCR virtuelle), qui se fait par un programme dans la plateforme « genome.ucsc.edu » (Figure 2.8)

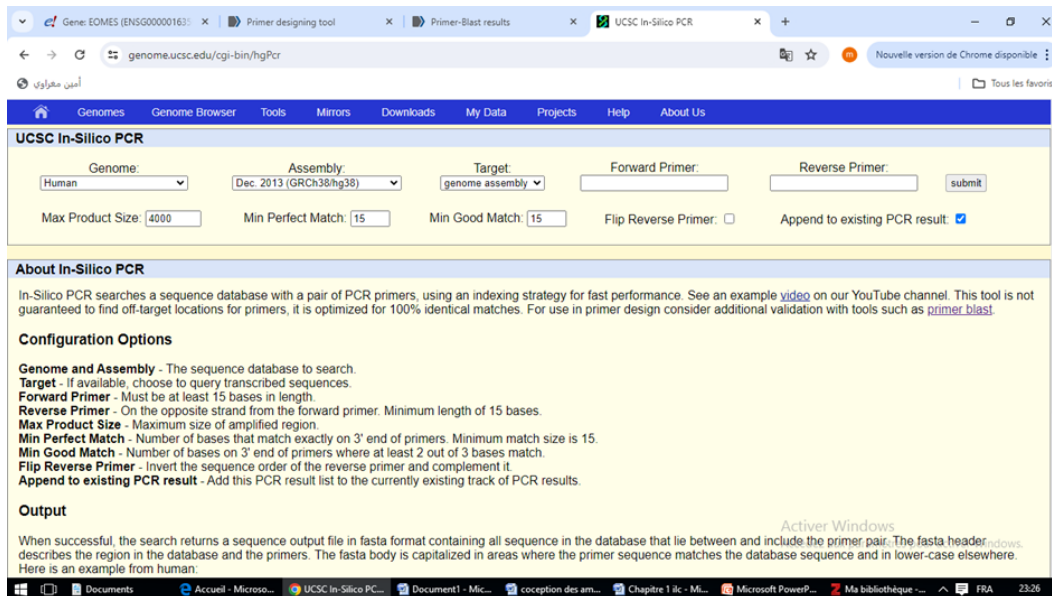


Figure 2.8. L'outil *in silico* PCR

Chapitre 3: Résultats

Chapitre 3. Résultats

3.1. Résultats de la conception des amorces

3.3.2. Résultats du Primer-BLAST

Pour concevoir nos amorces spécifiques du gène *EOMES*, j'ai utilisé le site Ensembl pour avoir l'intégrité du gène *EOMES*. Ce gène est composé de 6 exons. Dans ce travail, le troisième exon a été choisi pour sa taille idéale pour l'outil Primer. Ensuite, j'ai utilisé l'outil primer-blast. Cet outil m'a permis d'avoir 10 paires d'amorces spécifiques de l'exon 3 du gène *EOMES*.

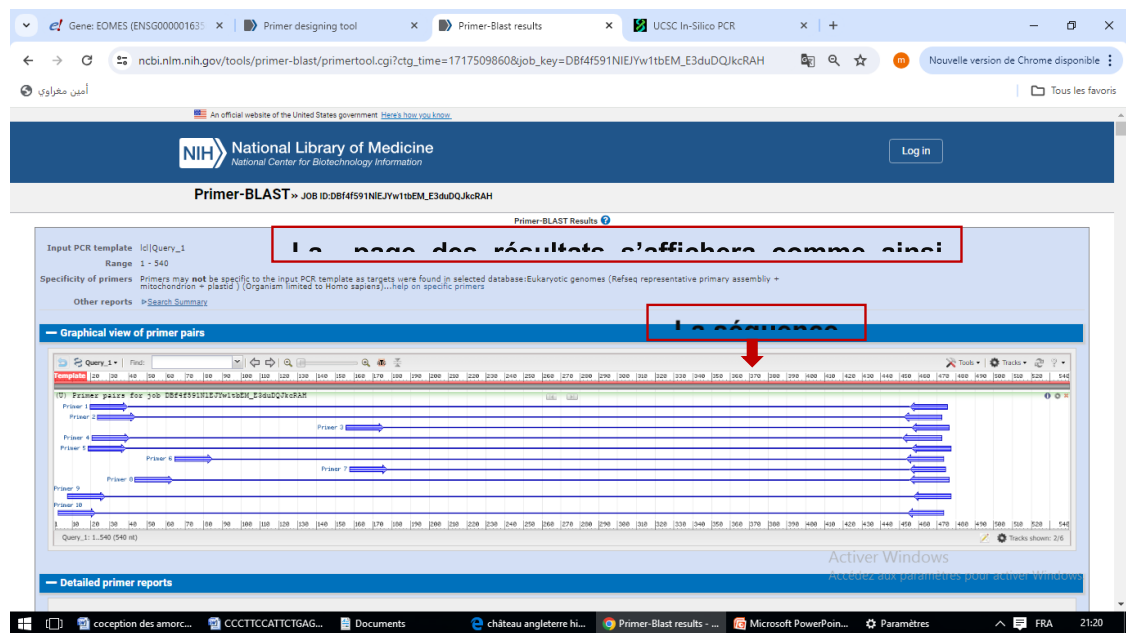


Figure 3.1. Résultats du primer –BLAST.

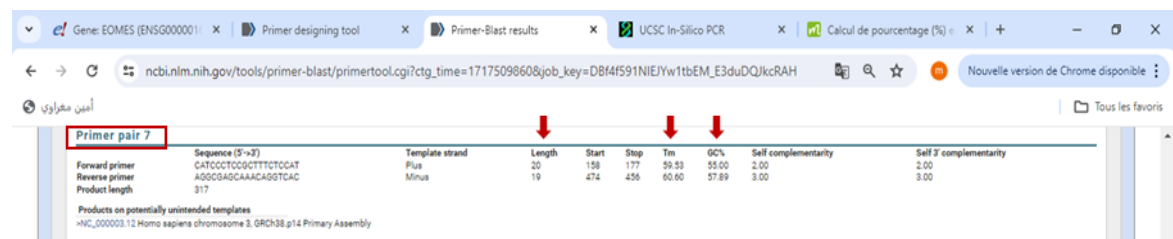


Figure 3.2. Primer pair 7.

J'ai choisi la septième paire d'amorces et les raisons suivantes :

- La température d'hybridation des amorces est d'environ 55 et 75 °C.
- Les longueurs des amorces sont de 15 et 35 nucléotides pour l'amorce sens et anti sens.
- Et enfin, le teneur en GC est de 55% pour l'amorce sens et de 57,89 pour l'amorce anti-sens. le teneur en GC d'une amorce doit être comprise ente 40 et 60%.

Chapitre 3: Résultats

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 3.2

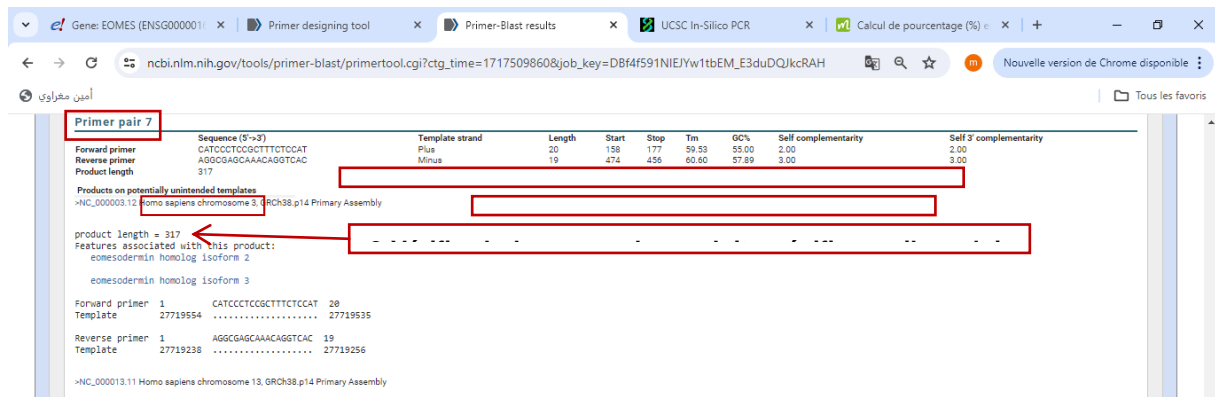


Figure 3.3. Résultats du Primer-BLAST.(1) il faut vérifier la longueur des amorces, leur températures d'hybridation et le rapport GC%, ensuite(2) il faut vérifier que c'est bien l'espèce et le chromosome du gène voulu, puis (3) vérifier la longueur du produit spécifique <1000pb.



Figure 3.4. Résultats du Primer- BLAST. Vérifier la longueur du produit spécifique < 1000pb et s'assure que toutes les produit aspécifique ont une longueur de >1000pb.

3.1.2. Résultats de confirmation par *in-silico* PCR

Les résultats obtenus nous ont confirmés la taille du produit spécifique obtenus 317 pb ainsi que la spécificité des amorces conçues. Les informations obtenues confirment aussi le chromosome 3 porteur du gène *EOMES*, la séquence des amorces et la température d'hybridation (Figure 3.6). Donc, ce résultat a confirmé la fiabilité des amorces que j'ai choisies.

Chapitre 4 : Conclusions et perspectives

Chapitre 4 : Conclusions et perspectives

Les ILCs sont des cellules qui jouent un rôle essentiel dans la défense contre les agents pathogènes. Contrairement aux lymphocytes T, les ILCs ne possèdent pas de récepteurs spécifiques de l'antigène réarrangés, mais réagissent rapidement à une variété de signaux innés. On distingue trois principaux groupes d'ILCs. Les ILCs du groupe 1 sont composés de cellules ILC1s et de cellules NK. Ces cellules produisent l'IFN- γ et contribuent à une réponse immunitaire efficace contre les virus. Les ILC 2s secrètent IL-13, IL-5 et IL-4, qui jouent un rôle dans la réponse immunitaire contre les parasites. Enfin, les ILC3s participent aux réponses antibactériennes par l'induction d'une inflammation chronique, le remodelage et la réparation grâce à la production d'IL-1 et à l'équilibre intestinal.

Il est important de souligner que les ILC1s se caractérisent par l'expression du facteur de transcription Eomes, qui joue un rôle essentiel dans la régulation de l'immunité de type 1 et la différenciation. De plus, leur maturation précoce favorise la maturation des cellules NK, ce qui entraîne une activation plus rapide des récepteurs NK et une amélioration de l'expression de CD16. L'étude de son expression en utilisant des techniques de biologie moléculaire, notamment la PCR, permet de faciliter la caractérisation des cellules impliquées dans l'immunité anti infectieuse.

La réussite de la PCR nécessite la fiabilité de tous les éléments impliqués dans la technique. Plus précisément, la conception des amorces fiables à l'aide de l'outil primer-blast constitue une étape clé.

Chapitre 5 : Bibliographie

Bibliographie

Ahrberg, Christian D., Bojan Robert Ilic, Andreas Manz, et Pavel Neužil. 2016. « Handheld Real-Time PCR Device ». *Lab on a Chip* 16 (3): 586-92. <https://doi.org/10.1039/C5LC01415H>.

Almeida, F.F., et G.T. Belz. 2016. « 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>.

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>.

Barbier, François, et Michel Wolff. 2010. « Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa*: Vers l'impasse thérapeutique ? » *médecine/sciences* 26 (11): 960-68. <https://doi.org/10.1051/medsci/20102611960>.

Barkleit, Astrid, Henry Moll, et Gert Bernhard. 2008. « Interaction of Uranium(vi) with Lipopolysaccharide ». *Dalton Transactions*, n° 21, 2879. <https://doi.org/10.1039/b715669c>.

Barnig, Cindy, Manuela Cernadas, Stefanie Dutile, Xiaoli Liu, Mark A. Perrella, Shamsah Kazani, Michael E. Wechsler, Elliot Israel, et Bruce D. Levy. 2013. « Lipoxin A₄ Regulates Natural Killer Cell and Type 2 Innate Lymphoid Cell Activation in Asthma ». *Science Translational Medicine* 5 (174). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004812>.

Beaussart, Audrey, Amy E. Baker, Sherry L. Kuchma, Sofiane El-Kirat-Chatel, George A. O'Toole, et Yves F. Dufrêne. 2014. « Nanoscale Adhesion Forces of *Pseudomonas Aeruginosa* Type IV Pili ». *ACS Nano* 8 (10): 10723-33. <https://doi.org/10.1021/nn5044383>.

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>.

Biassoni, Roberto, et Alessandro Raso, éd. 2020. *Quantitative Real-Time PCR: Methods and Protocols*. Second edition. Methods in Molecular Biology 2065. New York, NY: Humana Press.

Bordon, Yvonne. 2014. « On the Origin of ILCs ». *Nature Reviews Immunology* 14 (3): 133-133. <https://doi.org/10.1038/nri3629>.

Borger, Jessica G., Maverick Lau, et Margaret L. Hibbs. 2019. « The Influence of Innate Lymphoid Cells and Unconventional T Cells in Chronic Inflammatory Lung Disease ». *Frontiers in Immunology* 10 (juillet):1597. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01597>.

Chapitre 5 : Bibliographie

Bouteiller, Mathilde, Charly Dupont, Yvann Bourigault, Xavier Latour, Corinne Barbey, Yoan Kontoghiorghi, et Annabelle Merieau. 2021. « Pseudomonas Flagella: Generalities and Specificities ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (7): 3337. <https://doi.org/10.3390/ijms22073337>.

Burrows, Lori L. 2012. « *Pseudomonas Aeruginosa* Twitching Motility: Type IV Pili in Action ». *Annual Review of Microbiology* 66 (1): 493-520. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150055>.

Chen, Wen-Jen, Tzu-Yen Kuo, Feng-Chia Hsieh, Pi-Yu Chen, Chang-Sheng Wang, Yu-Ling Shih, Ying-Mi Lai, Je-Ruei Liu, Yu-Liang Yang, et Ming-Che Shih. 2016. « Involvement of Type VI Secretion System in Secretion of Iron Chelator Pyoverdine in *Pseudomonas Taiwanensis* ». *Scientific Reports* 6 (septembre):32950. <https://doi.org/10.1038/srep32950>.

Crinier, Adeline, Eric Vivier, et Mathieu Bléry. 2019. « Helper-like Innate Lymphoid Cells and Cancer Immunotherapy ». *Seminars in Immunology* 41 (février):101274. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.04.002>.

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).

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.

Douarche, Carine, Virginie Bailleux, Catherine Even, Jean-Marc Allain, Christophe Regeard, et Éric Raspaud. 2018. « La mécanique des biofilms à la surface de liquides ». *Reflète de la physique*, n° 56 (janvier), 20-24. <https://doi.org/10.1051/refdp/201856020>.

Duan, Qiangde, Mingxu Zhou, Liqian Zhu, et Guoqiang Zhu. 2013. « Flagella and Bacterial Pathogenicity ». *Journal of Basic Microbiology* 53 (1): 1-8. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100335>.

Elkins, Kelly M. 2015. « 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.

Elleboudy, Nooran, Mohammad Aboulwafa, et Nadia Hassouna. 2013. « Phospholipases C from *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus* isolates, chromosome-mediated enzymes with roles in virulence ». *TURKISH JOURNAL OF BIOLOGY* 37:433-42. <https://doi.org/10.3906/biy-1204-74>.

Elleboudy, Nooran Sherif, Mohammad Mabrouk Aboulwafa, et Nadia Abdel-Haleem Hassouna. 2014. « Phospholipase C from *Pseudomonas Aeruginosa* and *Bacillus Cereus*; Characterization of Catalytic

Chapitre 5 : Bibliographie

Activity ». *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 7 (11): 860-66. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60150-4](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60150-4).

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

Geginat, Jens, Chiara Vasco, Paola Gruarin, Raoul Bonnal, Grazisa Rossetti, Ylenia Silvestri, Elena Carelli, et al. 2023. « Eomesodermin-expressing Type 1 Regulatory (EOMES⁺ Tr1)-like T Cells: Basic Biology and Role in Immune-mediated Diseases ». *European Journal of Immunology* 53 (5): 2149775. <https://doi.org/10.1002/eji.202149775>.

Gordon, Scott M., Julie Chaix, Levi J. Rupp, Junmin Wu, Sharline Madera, Joseph C. Sun, Tullia Lindsten, et Steven L. Reiner. 2012. « The Transcription Factors T-Bet and Eomes Control Key Checkpoints of Natural Killer Cell Maturation ». *Immunity* 36 (1): 55-67. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.11.016>.

Green, Michael R., et Joseph Sambrook. 2019. « Nested Polymerase Chain Reaction (PCR) ». *Cold Spring Harbor Protocols* 2019 (2): pdb.prot095182. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095182>.

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

Harly, Christelle, Maggie Cam, Jonathan Kaye, et Avinash Bhandoola. 2018. « Development and Differentiation of Early Innate Lymphoid Progenitors ». *Journal of Experimental Medicine* 215 (1): 249-62. <https://doi.org/10.1084/jem.20170832>.

Herbert, De'Broski, Bonnie Douglas, et Kelly Zullo. 2019. « Group 2 Innate Lymphoid Cells (ILC2): Type 2 Immunity and Helminth Immunity ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (9): 2276. <https://doi.org/10.3390/ijms20092276>.

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>.

Jaton, Katia, et Gilbert Greub. 2007. « PCR En Microbiologie : De l'amplification de l'ADN à l'interprétation Du Résultat ». *Revue Médicale Suisse* 3 (106): 931-38. <https://doi.org/10.53738/REVMED.2007.3.106.0931>.

Chapitre 5 : Bibliographie

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. 2020. « 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>.

Kaminski, Amber, Kajal H. Gupta, Josef W. Goldufsky, Ha Won Lee, Vineet Gupta, et Sasha H. Shafikhani. 2018. « Pseudomonas Aeruginosa ExoS Induces Intrinsic Apoptosis in Target Host Cells in a Manner That Is Dependent on Its GAP Domain Activity ». *Scientific Reports* 8 (1): 14047. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32491-2>.

Karunanathie, Harsheni, Ping Siu Kee, Shioh Fern Ng, Martin A. Kennedy, et Eng Wee Chua. 2022. « PCR Enhancers: Types, Mechanisms, and Applications in Long-Range PCR ». *Biochimie* 197 (juin):130-43. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.02.009>.

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/>.

Kiekens, Laura, Wouter Van Looche, Sylvie Taveirne, Sigrid Wahlen, Eva Persyn, Els Van Ammel, Zenzi De Vos, et al. 2021. « T-BET and EOMES Accelerate and Enhance Functional Differentiation of Human Natural Killer Cells ». *Frontiers in Immunology* 12 (septembre):732511. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.732511>.

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

Klose, Christoph S. N., 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>.

Knox, James J., Gabriela L. Cosma, Michael R. Betts, et Laura M. McLane. 2014. « Characterization of T-Bet and Eomes in Peripheral Human Immune Cells ». *Frontiers in Immunology* 5 (mai). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00217>.

Chapitre 5 : Bibliographie

Korchagina, Anna A., Ekaterina Koroleva, et Alexei V. Tumanov. 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>.

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

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).

Lebeaux, David, et Jean-Marc Ghigo. 2012. « Infections associées aux biofilms: Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale ? » *médecine/sciences* 28 (8-9): 727-39. <https://doi.org/10.1051/medsci/2012288015>.

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>.

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>.

McKenzie, Andrew N. J. 2014. « Type-2 Innate Lymphoid Cells in Asthma and Allergy ». *Annals of the American Thoracic Society* 11 (Supplement 5): S263-70. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201403-097AW>.

McKinzie, Page B., et Meagan B. Myers. 2023. « A Brief Practical Guide to PCR ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 2621:3-13. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2950-5_1.

Mérens, Audrey, Hervé Delacour, Patrick Plésiat, Jean-Didier Cavallo, et Katy Jeannot. 2011. « Pseudomonas aeruginosa et résistance aux antibiotiques ». *Revue Francophone des Laboratoires* 2011 (435): 49-62. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(11\)71102-9](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(11)71102-9).

Mohsen, Michael G, Debin Ji, et Eric T Kool. 2019. « Polymerase Synthesis of Four-Base DNA from Two Stable Dimeric Nucleotides ». *Nucleic Acids Research* 47 (18): 9495-9501. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz741>.

Chapitre 5 : Bibliographie

Morand, A., et J.-J. Morand. 2017. « Pseudomonas aeruginosa en dermatologie ». *Annales de Dermatologie et de Vénérologie* 144 (11): 666-75. <https://doi.org/10.1016/j.annder.2017.06.015>.

Nowroozi, Jamileh, Abbas Akhavan Sepahi, et Afrooz Rashnonejad. 2012. « Pyocyanine Biosynthetic Genes in Clinical and Environmental Isolates of Pseudomonas Aeruginosa and Detection of Pyocyanine's Antimicrobial Effects with or without Colloidal Silver Nanoparticles ». *Cell Journal* 14 (1): 7-18.

Ozturk, Ahmet Rasit, et Tolga Can. 2017. « A Multiplex Primer Design Algorithm for Target Amplification of Continuous Genomic Regions ». *BMC Bioinformatics* 18 (1): 306. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1716-7>.

Pathophysiological aspects of proteases. 2017. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg.

Sauer, Karin, Paul Stoodley, Darla M. Goeres, Luanne Hall-Stoodley, Mette Burmølle, Philip S. Stewart, et Thomas Bjarnsholt. 2022. « The Biofilm Life Cycle: Expanding the Conceptual Model of Biofilm Formation ». *Nature Reviews Microbiology* 20 (10): 608-20. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>.

Sheeba, C.J., et M.P.O. Logan. 2017. « The Roles of T-Box Genes in Vertebrate Limb Development ». In *Current Topics in Developmental Biology*, 122:355-81. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.08.009>.

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>.

Spits, Hergen, et Tom Cupedo. 2012. « Innate Lymphoid Cells: Emerging Insights in Development, Lineage Relationships, and Function ». *Annual Review of Immunology* 30 (1): 647-75. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075053>.

Stosik, Michał, Beata Tokarz-Deptuła, et Wiesław Deptuła. 2024. « Innate Lymphoid Cells (ILCs) in Teleosts against Data on ILCs in Humans ». *Fish & Shellfish Immunology* 146 (mars):109415. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2024.109415>.

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

Taggenbrock, Renske L. R. E., et Klaas P. J. M. van Gisbergen. 2023. « ILC1: Development, Maturation, and Transcriptional Regulation ». *European Journal of Immunology* 53 (2): e2149435. <https://doi.org/10.1002/eji.202149435>.

Chapitre 5 : Bibliographie

Taggenbrock, Renske L.R.E., et Klaas P.J.M. Van Gisbergen. 2023. « ILC1: Development, Maturation, and Transcriptional Regulation ». *European Journal of Immunology* 53 (2): 2149435. <https://doi.org/10.1002/eji.202149435>.

Tang, Yi-Wei, éd. 2013. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. 2. ed. New York, NY: Springer.

Tremblay, Yannick D. N., Skander Hathroubi, et Mario Jacques. 2014. « [Bacterial biofilms: their importance in animal health and public health] ». *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne De Recherche Veterinaire* 78 (2): 110-16.

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).

Wagener, Brant M., Naseem Anjum, Sarah C. Christiaans, Morgan E. Banks, Jordan C. Parker, Adam T. Threet, Rashidra R. Walker, et al. 2020. « Exoenzyme Y Contributes to End-Organ Dysfunction Caused by Pseudomonas Aeruginosa Pneumonia in Critically Ill Patients: An Exploratory Study ». *Toxins* 12 (6): 369. <https://doi.org/10.3390/toxins12060369>.

Willmer, Tarryn, Aretha Cooper, Jade Peres, Rehana Omar, et Sharon Prince. 2017. « The T-Box Transcription Factor 3 in Development and Cancer ». *BioScience Trends* 11 (3): 254-66. <https://doi.org/10.5582/bst.2017.01043>.

Wood, Stephen J., Timothy M. Kuzel, et Sasha H. Shafikhani. 2023. « Pseudomonas Aeruginosa: Infections, Animal Modeling, and Therapeutics ». *Cells* 12 (1): 199. <https://doi.org/10.3390/cells12010199>.

Yokota, Yoshifumi, Ahmed Mansouri, Seiichi Mori, Seiichi Sugawara, Satoko Adachi, Shin-Ichi Nishikawa, et Peter Gruss. 1999. « Development of Peripheral Lymphoid Organs and Natural Killer Cells Depends on the Helix–Loop–Helix Inhibitor Id2 ». *Nature* 397 (6721): 702-6. <https://doi.org/10.1038/17812>.

Zhang, Jiang, Marie Marotel, Sébastien Fauteux-Daniel, Anne-Laure Mathieu, Sébastien Viel, Antoine Marçais, et Thierry Walzer. 2018a. « T-bet and Eomes Govern Differentiation and Function of Mouse and Human NK Cells and ILC1 ». *European Journal of Immunology* 48 (5): 738-50. <https://doi.org/10.1002/eji.201747299>.

———. 2018b. « T-bet and Eomes Govern Differentiation and Function of Mouse and Human NK Cells and ILC1 ». *European Journal of Immunology* 48 (5): 738-50. <https://doi.org/10.1002/eji.201747299>.

Chapitre 5 : Bibliographie

Zhu, Ting, Longwei Qiao, Qian Wang, Rui Mi, Jinnan Chen, Yaojuan Lu, Junxia Gu, et Qiping Zheng. 2017. « T-Box Family of Transcription Factor-TBX5, Insights in Development and Disease ». *American Journal of Translational Research* 9 (2): 442-53.

Résumé

Introduction : Les cellules lymphoïdes innées (ILCs) jouent un rôle crucial dans la protection contre les infections bactériennes. Les sous populations des ILCs se distinguent par l'expression d'une grande variété de facteurs de transcription et la production d'une multitude de cytokines. L'eomesodermin (*EOMES*) est une protéine exprimée par plusieurs cellules immunitaire et est impliquée dans la régulation de l'immunité de type 1 et la différenciation, ainsi que dans la maturation précoce des cellules NK.

Objectif : Elaboration des séquences d'oligonucléotides qui serviront d'amorces pour l'amplification du gène *Eomesodermin* par PCR.

Matériel et méthodes : afin de concevoir des amorces spécifiques du gène *EOMES*, quelques outils de la bioinformatique ont été utilisés. D'abord, la base de données ensemble.org a été utilisé pour rechercher des séquences spécifiques du gène *Eomesodermin*. Ensuite, l'outil "Primer-BLAST", fourni par NCBI, a été utilisé pour concevoir des amorces encadrant l'exon 3 du gène *Eomesodermin*. Enfin, la fiabilité des paires d'amorces répondant aux critères de bonnes amorces a été testée grâce à la PCR *in silico*.

Résultats : L'utilisation de l'outil Primer-BLAST m'a permis d'obtenir une amorce spécifique pour le gène *Eomesodermin*, à savoir :-Forward primer « CATCCCTCCGCTTTCTCCAT », Révers primer « AGGCGAGCAAACAGGTAC » avec un produit spécifique de 317 Pb, Tm (forward primer 59,53 °C, revers primer 60,60 °C), la teneur en GC est de 55% pour l'amorce Sens et de 57,89 pour l'amorce Anti-sens, et les deux amorces ont une longueur de 20 nucléotides.

Conclusion : La conception d'une paire d'amorces appropriée permettrait de réussir la technique PCR, ce qui permet d'amplifier correctement le gène *Eomesodermin* et d'étudier son rôle lors d'une infection bactérienne.

Mots clé : ILC1, *Eomesodermin*, Primer-BLAST, Primer.

ملخص

مقدمة: تلعب الخلايا اللمفاوية الفطرية (ILCs) دورًا حاسمًا في الحماية من الالتهابات البكتيرية. تتميز المجموعات الفرعية للـ ILCs بالتعبير عن مجموعة واسعة من عوامل النسخ وإنتاج عدد كبير من السيتوكينات (*Eomesodermin* (*EOMES*)). هو بروتين يتم التعبير عنه بواسطة العديد من الخلايا المناعية ويشارك في تنظيم مناعة النوع الأول والتمايز، وكذلك في النضج المبكر للخلايا الفاتلة الطبيعية.

الهدف: تطوير تسلسلات قليل النوكليوتيد والتي ستكون بمثابة الاشعال لتضخيم جين الأيوميوزديرمين بواسطة PCR. المواد والطرق: من أجل تصميم بادئات محددة لجين *Eomesodermin* ، تم استخدام بعض أدوات المعلوماتية الحيوية. أولاً، تم استخدام قاعدة بيانات ensemble.org للبحث عن تسلسلات محددة لجين *Eomesodermin*. بعد ذلك، تم استخدام أداة "Primer-BLAST" ، المقدمة من NCBI ، لتصميم الاشعال المتاخمة للإكسون 2 من جين *Eomesodermin*. أخيرًا، تم اختبار موثوقية أزواج التمهيدي التي تستوفي معايير الاشعال الجيدة باستخدام *silico* PCR.

نتائج: أتاح لي استخدام أداة Primer-BLAST الحصول على برايمر محدد لجين *Eomesodermin* ، يسمى: التمهيدي للكلمة "CATCCCTCCGCTTTCTCCAT" ، التمهيدي العكسي "AGGCGAGCAAACAGGTAC" مع منتج محدد يبلغ 317 Pb ، Tm (تمهيد أمامي 59.53 درجة مئوية، تمهيدي عكسي 60.60 درجة مئوية)، يكون محتوى GC 55% لمادة Sens التمهيدي و 57.89 لمادة Anti-sense التمهيدي، ويبلغ طول البادئين 20 نيوكليوتيدات. خاتمة: إن تصميم زوج مناسب من البادئات من شأنه أن يجعل تقنية PCR ناجحة، مما يسمح بتضخيم جين *Eomesodermin* بشكل صحيح ودراسة دوره أثناء العدوى البكتيرية.

الكلمات المفتاحية: ILC1 ، *Eomesodermin* ، Primer-BLAST ، Primer.

Abstract

Introduction: Innate lymphoid cells (ILCs) play a crucial role in protection against bacterial infections. The subpopulations of ILCs are distinguished by the expression of a wide variety of transcription factors and the production of a multitude of cytokines. *Eomesodermin* (*EOMES*) is a protein expressed by several immune cells and is involved in the regulation of type 1 immunity and differentiation, as well as in the early maturation of NK cells.

Objective: Development of oligonucleotide sequences which will serve as primers for the amplification of the *Eomesodermin* gene by PCR.

Material and methods: in order to design specific primers for the *Eomesodermin* gene, some bioinformatics tools were used. First, the ensemble.org database was used to search for specific sequences of the *Eomesodermin* gene. Then, the "Primer-BLAST" tool, provided by NCBI, was used to design primers bordering exon 3 of the *Eomesodermin* gene. Finally, the reliability of the primer pairs meeting the criteria for good primers was tested using *in silico* PCR.

Results: The use of the Primer-BLAST tool allowed me to obtain a specific primer for the *Eomesodermin* gene, namely: -Forward primer "CATCCCTCCGCTTTCTCCAT", Reverse primer "AGGCGAGCAAACAGGTAC" with a specific product of 317 Pb, Tm (forward primer 59.53 °C, reverse primer 60.60 °C), the GC content is 55% for the Sens primer and 57.89 for the Anti-sense primer, and the two primers have a length of 20 nucleotides.

Conclusion: The design of an appropriate pair of primers would make the PCR technique successful, allowing the *Eomesodermin* gene to be correctly amplified and its role during bacterial infection to be studied.

Key words: ILC1, *Eomesodermin*, Primer-BLAST, Primer.