

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

UNIVERSITE de TLEMCCEN  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de  
l'Univers

**Département de Biologie**

*Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et d'Immunologie W04144100*

# MEMOIRE

Présenté par

**DICH Ilham**

*En vue de l'obtention du*

**Diplôme de MASTER**

En Immunologie

## Thème

**Conception des amorces pour le gène IFNG et le profil pro-inflammatoire  
au cours de l'asthme allergique pédiatrique**

Soutenu le 09 Septembre 2020, devant le jury composé de :

Président	ARIBI Mourad	Professeur	Université de Tlemcen
Encadreur	EL MEZOUAR Chahrazede	MAA	Université de Tlemcen
Examinatrice	NOUARI Wafaa	MCB	Université de Tlemcen

**Année universitaire 2019/2020**

---

**Introduction** : L'asthme allergique est une maladie obstructive des poumons, implique une inflammation chronique des voies aériennes. La diversité génétique IFNG sur l'atteinte ou la prévention de cette pathologie reste à clarifier et on en sait peu sur l'intervention de cette cytokine.

L'étude de l'association des polymorphismes IFNG avec l'asthme allergique dans le cadre d'études cas-témoins nécessite des outils très sensibles notamment la réaction en chaîne de polymérase. Donc le choix d'une bonne paire d'amorces spécifique du gène IFNG est indispensable.

**Matériels et méthodes** : L'identification de la cible IFNG à l'aide de la base de données « Ensemble.org ». L'accès au Primer Blast pour le choix des amorces spécifiques.

**Résultats** : Choix du couple d'amorces spécifique de la région voulue qu'on amplifie suivant certains critères.

**Conclusions** : Les études d'association des polymorphismes du gène IFNG mettent en évidence l'intervention et l'expression de cette cytokine au cours de l'asthme allergique pédiatrique.

**Mots clés** : Asthme allergique , Gène IFNG , Amorces , Polymorphismes et PCR .

---

**Introduction** : Allergic asthma is an obstructive lung disease, involves a chronic inflammation of the airways. The genetic diversity IFNG on the risk of reaching or preventing this pathology remains to be clarified and little is known about the intervention of this cytokine.

The study of the association of IFNG polymorphisms with allergic asthma in the context of case-control studies requires very sensitive tools, in particular the polymerase chain reaction. Therefore the choice of a good primers pair specific of the IFNG gene is essential.

**Materials and methods** : Identifying the IFNG target using the « Ensemble.org » database. Access to the Primer Blast for the choice of specific primers .

**Results** : The choice of the pair primers specific to the region desired and that is used to amplify, following certain criteria of course.

**Conclusions** : Studies of association of polymorphisms IFNG gene highlight the intervention and expressing of this cytokine during allergic asthma.

**Key words** : Allergic asthma, IFNG gene , Primers , Polymorphisms and PCR.

**مقدمة:** الربو التحسسي هو مرض الانسداد الرئوي الذي يؤدي إلى إتهاب مزمن في الشعب الهوائية . التنوع الجيني للأنترفيرون غاما حول خطر الوصول إلى هذا المرض أو منعه لا يزال بحاجة إلى توضيح و لا يعرف إلا القليل عن تدخل هذا السيتوكين.

تتطلب دراسة إرتباط تعدد أشكال الأنترفيرون غاما مع الربو التحسسي في سياق دراسات الحالات و الشواهد أدوات حساسة للغاية على وجه الخصوص تفاعل البلمرة المتسلسل PCR . لذا فإن إختيار زوج جيد من البادئات الخاصة بجين الأنترفيرون غاما أمر ضروري .

**المواد و الأساليب :** تحديد الهدف "الأنترفيرون غاما" بإستخدام قاعدة البيانات Ensembl.org الولوج إلى Primer Blast لإختيار البادئات الخاصة .

**النتائج:** إختيار زوج مم البادئات الخاصة بالمنطقة المرغوبة بإتباع معايير معينة بالطبع.

**الإستنتاجات:** دراسات الإرتباط لتعدد أشكال جين الأنترفيرون غاما توضح التدخل و التعبير عن هذا السيتوكين في الربو التحسسي .

**الكلمات المفتاحية(الدالة) :** الربو التحسسي ، جين الأنترفيرون غاما ، البادئات الخاصة ، تعدد الأشكال و PCR.

Avec une profonde vulnérabilité, un désir ardent et grande joie , je rédigé cette partie où on sent que l'histoire prend fin...

Au début ,je tiens à remercier « ALLAH » de m'avoir donné l'opportunité de terminer ce modeste travail et d'atteindre ce niveau avec la propagation terrible de Corona , que Dieu nous protège.

Je remercie chaleureusement l'équipe d'Immunologie , particulièrement Professeur ARIBI Mourad Directeur de Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et d'Immunologie pour tous les échanges de connaissances et scientifiques que nous avons eu de sa part pour notre succès et notre supériorité.

Ma profonde gratitude à Madame NOUARI Wafa qui m'a aidé , m'a soutenu et c'était ma première motivation pour le choix de spécialité ...vraiment un énorme merci.

Mes sincères salutations à Madame BRAHAMI Nabila et Madame MESSAOUD Aida , et bien sûr sans oublier d'adresser mes remerciements particuliers à la Dame ELMEZOUAR Chahrazade qui a pris de soin pour terminer ce travail à travers ses notes , ses conseils et directives.

Je remercie tous les membres de la famille universitaire Faculté S.N.V/S.T.U : Professeures , administratifs et travailleurs qui ont tant donné..

Et les remerciements les plus importants seront pour parents surtout ma mère qui m'a tout donné depuis ma naissance. Je remercie également mes sœurs, mon frère et sans oublier mes chers petits Youness , Adel et Rayan pour leur soutien spirituel et moral à mon égard...je vous remerciés encore une fois .

Mes sincères remerciements à mes collègues , mes amies du Faculté S.N.V/S.T.U « Département de Biologie » , tout particulièrement les Immunologistes diplômés pour l'année universitaire 2019/2020...beaucoup de succès et de supériorité au futur ...

Enfin , je remercie du fond du mon cœur chaque personne de près ou de loin , a contribué à la réalisation de ce travail , à ma réussite et pour atteindre ce niveau...

Merci ...

## Table des matières

Résumé	II
Abstract	III
Résumé en arabe	IV
Avant-propos	V
Table des matières	VI
Liste des figures	VII
Liste des abréviations	X
Introduction	1
<b>Chapitre 1 : Revue de la littérature</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1 Asthme</b> .....	<b>2</b>
1.1.1 Définition .....	2
1.1.2 Facteurs environnementaux et génétiques contribuant au développement de l'asthme .....	3
1.1.3 Symptômes .....	3
1.1.4 Biomarqueurs d'identification d'asthme .....	3
1.1.5 Formes cliniques .....	4
1.1.5.1 Asthme non allergique .....	4
1.1.5.2 Asthme allergique .....	4
1.1.6 Mécanisme immunopathologique .....	4
1.1.7 Asthme et Microbiote intestinal.. .....	7
<b>1.2 Interféron gamma</b> .....	<b>8</b>
1.2.1 Définition .....	8
1.2.2 Signalisation de l'interféron gamma (IFNG) .....	8
1.2.3 IFN-gamma au cours d'asthme allergique pédiatrique .....	9
<b>1.3 Le gène IFNG et PCR</b> .....	<b>10</b>
1.3.1 Description .....	10
1.3.2 Polymorphismes du gène humain IFNG .....	11
1.3.3 PCR .....	11
1.3.3.1 Principe du PCR .....	11
1.3.3.2 Analyse des produits PCR .....	13
<b>Problématique et Objectif</b> .....	<b>13</b>
<b>But</b> .....	<b>13</b>

---

<b>Chapitre 2 : Matériel et Méthodes</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1 La conception des amorces</b> .....	<b>14</b>
<b>2.2 Le flux de travail pour concevoir une bonne paire d'amorces pour le gène IFNG</b> .....	<b>14</b>
2.2.1 L'identification de la cible IFNG( séquence) .....	<b>14</b>
2.2.2 Primer Blast .....	<b>16</b>
<b>2.3 L'analyse des résultats</b> .....	<b>21</b>
<b>Chapitre 3 : Résultats</b> .....	<b>22</b>
<b>3.1 Résultats de la conception d'amorces pour le gène IFNG</b> .....	<b>22</b>
<b>3.2 Interprétation des résultats</b> .....	<b>23</b>
<b>3.3 Confirmation des résultats</b> .....	<b>25</b>
<b>Chapitre 4 : Discussion</b> .....	<b>26</b>
<b>Chapitre 5 : Conclusions et perspectives</b> .....	<b>28</b>
<b>Chapitre 6 : Bibliographie</b> .....	<b>29</b>

---

Figure 1.1. Densité pulmonaire thoracique ( Tomodensitométrie)

Figure 1.2. Cellules immunitaires et cascade inflammatoire dans l'asthme

Figure 1.3. Cascade d'asthme inflammatoire allergique et non allergique

Figure 1.4. Production et signalisation d'IFN $\gamma$ .

Figure 1.5. Présentation schématique du principe PCR.

Figure 1.6. Localisation chromosomique du gène IFNG

Figure 1.7. Localisation chromosomique des gènes récepteurs IFNGR1 et IFNGR2

Figure 2.1. La base de données « Ensembl.org »

Figure 2.2. Recherche de séquences du gène IFNG

Figure 2.3. Le choix de la cible IFNG

Figure 2.4. Séquence du gène IFNG

Figures 2. 5 ,6 ,7 ,8 ,9 ,10 ,11 ,12 et 13. Les étapes de l'outil Primer Blast

Figure 3.1. Recherche des paires d'amorces spécifiques de gène IFNG

Figure 3.2. Vue graphique de la paire d'amorces choisie pour le gène IFNG

Figure 3.3. La paire d'amorces spécifique du gène IFNG

Figure 3.4. Confirmation du résultat par le site UCSC In-Silico PCR



**A**

**AHR** : Hyperréactivité des voies Aériennes

**ARE** : Éléments Riches en Au

**C**

**CA** : Microsatellites Dinucléotidiques

**CTL** : Lymphocytes T Cytotoxiques

**D**

**DPP-4** : Dipeptidyl peptidase 4

**Derp** : Dermatophagoïdes pteronyssinus

**E**

**FeNO** : Excrétion Fractionnée d'oxyde Nitrique

**G**

**GAS** : Site Activé par l'interféron gamma

**H**

**HDM** : Acarien de la poussière de maison

**I**

**IFN- gamma** : Interféron gamma

**IgE** : Immunoglobulines de type E

**ILC2** : Cellules Lymphoïdes Innées du groupe 2

**IRF** : Facteurs de Régulation de l'IFN

**ISG** : Gènes Stimulés par IFN

**Il-4** : Interleukine-4

**Il-5** : Interleukine-5

**Il-13** : Interleukine-13

**J**

**JAK** : Janus Kinases

**L**

**LTH2** : Lymphocytes T Auxiliaires de type 2

**LB** : Lymphocytes B

**LTH1** : Lymphocytes T Auxiliaires de type 1

**N**

**NF- $\kappa$ B** : Facteur nucléaire kappa-B

**P**

**PIAS** : Inhibiteurs de Protéines de la STAT Activé

**PCR** : Réaction en Chaîne par Polymérase

**S**

**SNP** : Polymorphismes Mononucléotidiques

**STAT** : Transducteur de Signal et l'activateur de la STAT activée

**SOCS** : Suppresseurs de la Signalisation des Cytokines

L'incapacité à résoudre l'inflammation des surfaces internes du corps entraîne des maladies inflammatoires chroniques, tels que l'asthme (Schett and Neurath, 2018). L'asthme constitue un vrai problème de santé publique qui touche 300 millions de personnes dans le monde et entraîne une morbidité et une mortalité (Joobeur et al., 2015; Schett and Neurath, 2018). L'asthme est une pathologie inflammatoire chronique et hétérogène (Mamessier et al., 2005). Elle est régulée par des mécanismes moléculaires distincts (Choy et al., 2015). Cette maladie est définie par 2 formes cliniques majeures : l'asthme non allergique et l'asthme allergique. L'asthme allergique est un trouble inflammatoire bronchique des voies respiratoires caractérisée par des réactions inflammatoires de type Th2 (lymphocytes T helper de type 2) impliquant la coordination des composants essentiels des réponses immunitaires innées et adaptatives notamment des cellules, des molécules et des cytokines (Ferrini et al., 2017).

Les cytokines produites par divers types de cellules sont identifiées comme des moteurs importants influençant sur le fonctionnement de la réponse immunitaire au cours d'asthme (Kuruvilla et al., 2019; Smith and Humphries, 2009). Interféron gamma (IFNG) est l'un des médiateurs les plus critiques de l'immunité et de l'inflammation (Al-Mohaya et al., 2016a). C'est une cytokine pro-inflammatoire, capable d'activer divers gènes au cours de l'immunité innée et adaptative grâce à ses effets immunomodulateurs et immunostimulateurs dans de nombreuses maladies inflammatoires chroniques (Popadic et al., 2012). Puisque l'IFN-gamma étant la marque distinctive de profil pro-inflammatoire dans plusieurs cellules immunitaires, l'étude du gène IFNG mettra en lumière son expression, sa régulation et l'analyse de ses polymorphismes qui permettrait de détecter une anomalie génétique de la régulation de ce gène qui pourrait jouer un rôle dans la physiopathologie d'asthme (Dwivedi et al., 2013).

Ce gène est parmi les gènes immunorégulateurs les plus clonés, et est localisé avec l'interleukine-22 et l'Interleukine-26 sur le chromosome 12 (Savan et al., 2009). Le génotypage de polymorphismes mononucléotidiques (SNP) de ce gène permettra une prédiction de la susceptibilité individuelle au développement de certaines maladies inflammatoires en réalisant différentes méthodes et techniques telles que la PCR (Popadic et al., 2012). Cette dernière, est une application *in vitro* pour améliorer du pouvoir sur les génomes, en produisant des milliards de copies d'un fragment ou d'un gène d'ADN ce qui permet l'identification de ses séquences ; et pour arriver au succès d'une expérience de PCR et aux résultats souhaités, une conception d'amorces appropriées est indispensable et fera l'objectif principale de notre travail (Garibyan and Avashia, 2013a; Lorenz, 2012).

Notre travail est de concevoir une bonne paire d'amorces spécifique du gène IFNG dans le cadre d'une étude Cas-Témoins plus tard ; ce qui nous permettra de mieux comprendre l'intervention de cette cytokine au cours d'asthme allergique dans le futur.

## Chapitre 1 : Revue de la littérature

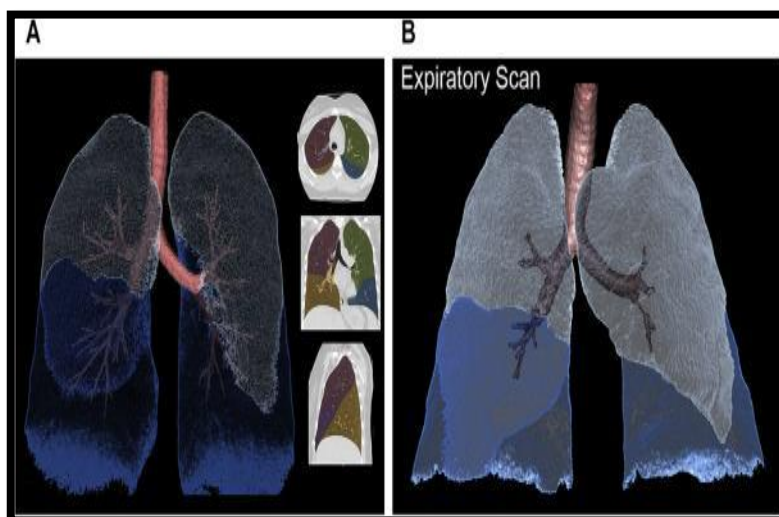
### 1.1 Asthme

#### 1.1.1 Définition :

L'asthme est la maladie chronique la plus fréquente en pédiatrie. (Philpott et *al.*, 2010). C'est une affection respiratoire chronique inflammatoire et hétérogène qui englobe plusieurs variantes à la fois cliniques et physiopathologiques, et appartient au groupe des maladies obstructives (Grzegorz Kardas et *al.*, 2020). Elle est aussi polymorphe dans laquelle de nombreuses cellules du système immunitaire inné et adaptatif agissent avec les cellules épithéliales pour provoquer une allergie de type I et une anaphylaxie (Joobeur et *al.*, 2015; Lambrecht and Hammad, 2015; Lee et *al.*, 2019) . De plus, cette maladie est caractérisée par une inflammation persistante avec une hyperréactivité épisodique des voies aériennes (AHR), une surproduction de mucus , un rétrécissement des voies respiratoires et un remodelage avec des degrés variables de l'inflammation de type 2 (Barnig et *al.*, 2018; Choy et *al.*, 2015; Lambrecht and Hammad, 2015).

L'asthme est comme une entité pathologique unique (Choy et *al.*, 2015) ; il représente un réel problème de santé publique à cause de l'augmentation observable de sa prévalence dans plusieurs pays (Joobeur et *al.*, 2015).

La figure 1.1 représente la différence entre le volume du poumon, des lobes et de l'arbre bronchique d'un sujet normale et d'un sujet souffrant d'asthme sévère.



**Figure 1.1. Densité pulmonaire thoracique (Tomodensitométrie) (Trivedi et al., 2017) . Le panneau A :** montre un rendu 3D du volume du poumon , des lobes et de l'arbre bronchique détecté à partir d'une image CT du poumon complètement gonflé d'un sujet normale. **Le panneau B :** CT thoracique montre un rendu de volume similaire en utilisant l'image expiratoire ( dans ce cas , la capacité résiduelle fonctionnelle) d'un sujet souffrant d'asthme sévère. Traitement d'image dérivé du logiciel Apollo ( VIDA Diagnostics, Coralville ,IA).

### 1.1.2 Facteurs environnementaux et génétiques contribuant au développement de l'asthme :

L'asthme provient des interactions complexes entre la susceptibilité génétique de l'hôte et des facteurs environnementaux (Joobeur et *al.*, 2015). Les déclencheurs les plus courants de l'asthme, sont liés à un facteur très important dans l'aggravation de cette maladie qui est la pollution d'air ; ces déclencheurs sont les allergènes en suspension d'air notamment l'acarien de la poussière de maison (HDM) et dermatophagoïdes pteronyssinus (Derp) (Ferrini et *al.*, 2017; Kuruvilla et *al.*, 2019).

En outre, il existe d'autres facteurs qui contribuent aussi à l'exacerbation de l'asthme notamment les infections virales, la fumée de tabac, le froid, le stress affectif et toute une gamme éventail de facteurs chimiques et physiques (Irvin et *al.*, 2014; Philpott et *al.*, 2010).

### 1.1.3 Symptômes

L'asthme se manifeste par des symptômes variables allant de la toux persistante à des périodes répétées d'essoufflement, respiration sifflante et oppression thoracique (Lambrecht and Hammad, 2015); elle s'explique par une obstruction variable du flux d'air (Kuruvilla et *al.*, 2019).

### 1.1.4 Biomarqueurs d'identification d'asthme :

Un biomarqueur est une caractéristique mesurée, considérée comme un indicateur de divers processus normaux ou pathogènes (Kuruvilla et *al.*, 2019). L'identification de ces biomarqueurs fournit des informations précieuses facilitant le phénotypage et permettant aux médecins de personnaliser le traitement avec des agents biologiques ciblés (Kim et *al.*, 2017).

Les biomarqueurs de l'asthme sont :

- Éosinophiles : la présence d'un nombre élevé des éosinophiles est une caractéristique de l'asthme (Irvin et *al.*, 2014).
- Immunoglobuline E (IgE) : est le biomarqueur prédominant, produit au début de la cascade d'asthme allergique
- Les cytokines : telles que l'interleukine-4 (IL-4), l'interleukine-5 (IL-5) et l'interleukine-13 (IL-13) provient des Th2
- Excrétion Fractionnée d'Oxyde Nitrique (FeNO) : qui peut être une mesure standardisée et rapide dans la respiration expirée
- Périostine : considéré comme un biomarqueur de substitution à cause de son expression extracellulaire dans les tissus bronchiques malgré l'utilisation de corticostéroïdes. Son expression résulte de la présence d'IL-4 et d'IL-13.
- Dipeptidyl Peptidase 4 (DPP-4) : qui est une forme circulante de CD26, une augmentation de l'expression d'ARNm de DPP-4 des cellules épithéliales bronchiques a été observée chez les patients asthmatiques (Kim et *al.*, 2017; Kuruvilla et *al.*, 2019).

### 1.1.5 Formes cliniques

Deux formes majeures d'asthme ont été définies : l'asthme non allergique, non atopique ou intrinsèque qui prédomine chez les groupes plus âgés et l'asthme allergique, atopique ou extrinsèque qui a une forte association avec l'enfance (Kuruvilla et al., 2019).

#### 1.1.5.1 Asthme non allergique :

Cette forme d'asthme se développe souvent plus tard dans la vie et est plus fréquente chez les femmes, elle s'associe à une rhinosinusite chronique, l'obésité et aux polypes nasaux et est difficile à traiter. L'asthme intrinsèque est caractérisée par l'absence d'implication évidente du système immunitaire adaptatif tel que les LTH2 et la réactivité des immunoglobulines E (IgE) aux allergènes dans le sérum (Lambrecht and Hammad, 2015). L'incidence de l'asthme non atopique est faible jusqu'à ce qu'elle atteigne un sommet à la fin de l'âge adulte (Pakkasela et al., 2020).

#### 1.1.5.2 Asthme allergique :

Asthme atopique ou extrinsèque est une affection inflammatoire bronchique chronique des voies respiratoires qui touche essentiellement le sujet jeune en pleine activité (Ferrini et al., 2017; Joobeur et al., 2015). La plupart des cas d'enfants souffrant d'asthme allergique impliquent des actions complémentaires de réponses immunitaires innées et adaptatives (Ferrini et al., 2017).

Cette maladie est caractérisée par une inflammation éosinophile, une réponse TH2 et la présence d'IgE spécifiques aux allergènes (Irvin et al., 2014).

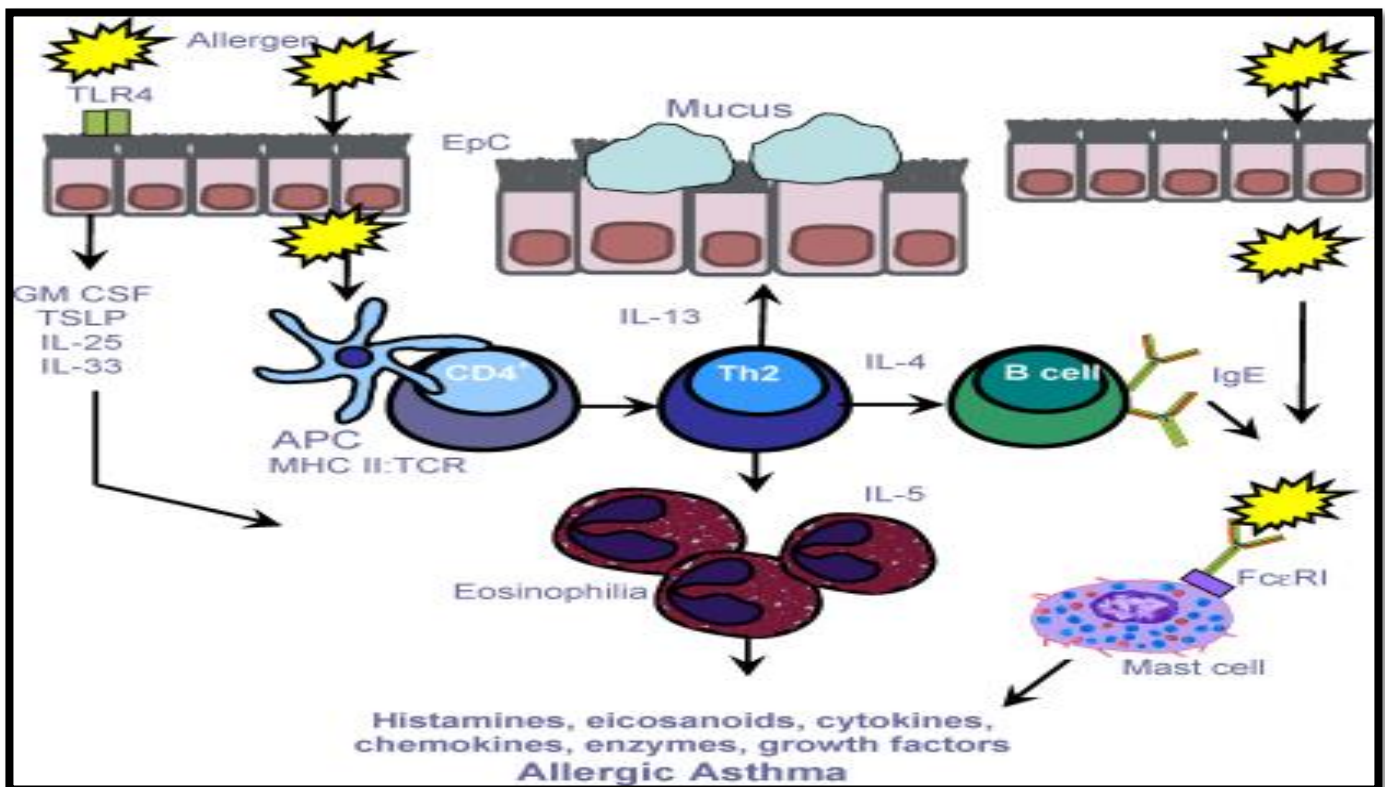
Chez l'enfant, l'asthme allergique débute par une sensibilisation allergique accompagnée d'eczéma au cours de la première année de vie ; ces enfants développent une Rhinite allergique plus tard et peuvent évoluer vers l'asthme (Lambrecht and Hammad, 2015).

Enfin, l'incidence de la forme clinique extrinsèque est la plus élevée dans la petite enfance et diminue régulièrement avec l'âge (Pakkasela et al., 2020).

### 1.1.6 Mécanisme immunopathologique

L'asthme est une maladie inflammatoire des poumons qui est associée à une réponse immunitaire plus complexe et variable des LT contre allergènes (Ford et al., 2001).

La figure 1.2 représente les différentes cellules et molécules intervenant dans la cascade inflammatoire d'asthme.



**Figure 1.2. Cellules immunitaires et cascade inflammatoire dans l'asthme (Murdoch and Lloyd, 2010).** Une ou des expositions initiales à un allergène entraînent l'activation de cellules TH2 spécifiques à l'allergène et la synthèse d'IgE. Les expositions ultérieures aux allergènes provoquent le recrutement, l'activation et à la libération de médiateurs des cellules inflammatoires. Les mastocytes sensibilisés aux IgE exprimant le récepteur IgE de haute affinité, libérant des médiateurs préformés et nouvellement synthétisés favorisant la perméabilité vasculaire, la contraction des muscles lisses et la production de mucus. Les chimiokines libérées par les cellules inflammatoires et résidentes recrutent directement les cellules inflammatoires caractérisées par les éosinophiles et les cellules TH2. Clé : APC : cellule présentatrice d'antigène ; ASM : muscle lisse des voies respiratoires ; Epc : cellule épithéliale ; TSLP : lymphopoïétine stromale thymique

Ces réponses des LTCD+4 sont hétérogènes, les voies inflammatoires d'un sous-type d'asthme particulier sont favorisées par de nombreux sous-ensembles lymphocytaires ; après plusieurs études et depuis la découverte des sous-populations de LTCD+4, le dogme traditionnel de l'asthme est celui des réponses des TH2 présents dans les poumons des patients asthmatiques et des IgE spécifiques, responsable à une infiltration considérable des éosinophiles an générant des quantités importantes des cytokines ( Figure 2)(Kuruvilla et *al.*, 2019).

Au début, les cellules présentatrices d'antigène (CPA) reconnaissent l'invasion répétée des allergènes conduisant à l'asthme ; après leur maturation , ces cellules migrent vers les ganglions drainants et présentent les peptides dérivées des allergènes aux LT naïfs via des molécules de CMH de class II, cette interaction conduit à l'activation et la polarisation des LT naïfs aux LTH2 qui libèrent l'IL-4 ,l'IL-5, et l'IL-13 en stimulant la montée des IgE via l'activation des lymphocytes B (LB) et l'augmentation de la population d'éosinophiles(Lee et *al.*, 2019). L'IL-4 et l'IL-13 agissent avec un complexe récepteur qui contient une chaîne IL-4Ra commune pour initier une cascade de signalisation par l'activation et la phosphorylation du transducteur de signal du facteur de transcription et l'activateur de transcription-6 (STAT-6) (Figure 2)(Kuruvilla et *al.*, 2019) .

Cependant, des études récentes ont montré des réponses immunitaires neutrophiles simultanées contrôlées par le sous-ensemble TH-17 des cellules T helper (Lambrecht and Hammad, 2015) et une expression d'IL-17 était associée à un asthme sévère (Irvin et al., 2014).

Des stratégies thérapeutiques dans l'asthme sont maintenant à l'étude pour cibler les voies inflammatoires TH-2 et TH-17 (Choy et al., 2015)

La contribution d'un certain nombre de cellules innées notamment les cellules épithéliales des voies respiratoires, les macrophages, les cellules dendritiques, et les cellules lymphoïdes innées du groupe 2 (ILC2) en réponses aux allergènes reste à définir entièrement (Ferrini et al., 2017). Pour les ILC2, un ensemble de preuves montrant que ces cellules sont particulièrement élevées dans les tissus des voies respiratoires et jouent un rôle important dans l'augmentation des réponses immunitaires de type 2 dans les voies respiratoires, produisant de l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 (Figure 3) (Kuruvilla et al., 2019).

La figure 1.3 représente la cascade inflammatoire des deux formes cliniques d'asthme : allergique et non allergique en précisant le type des lymphocytes qui intervient.

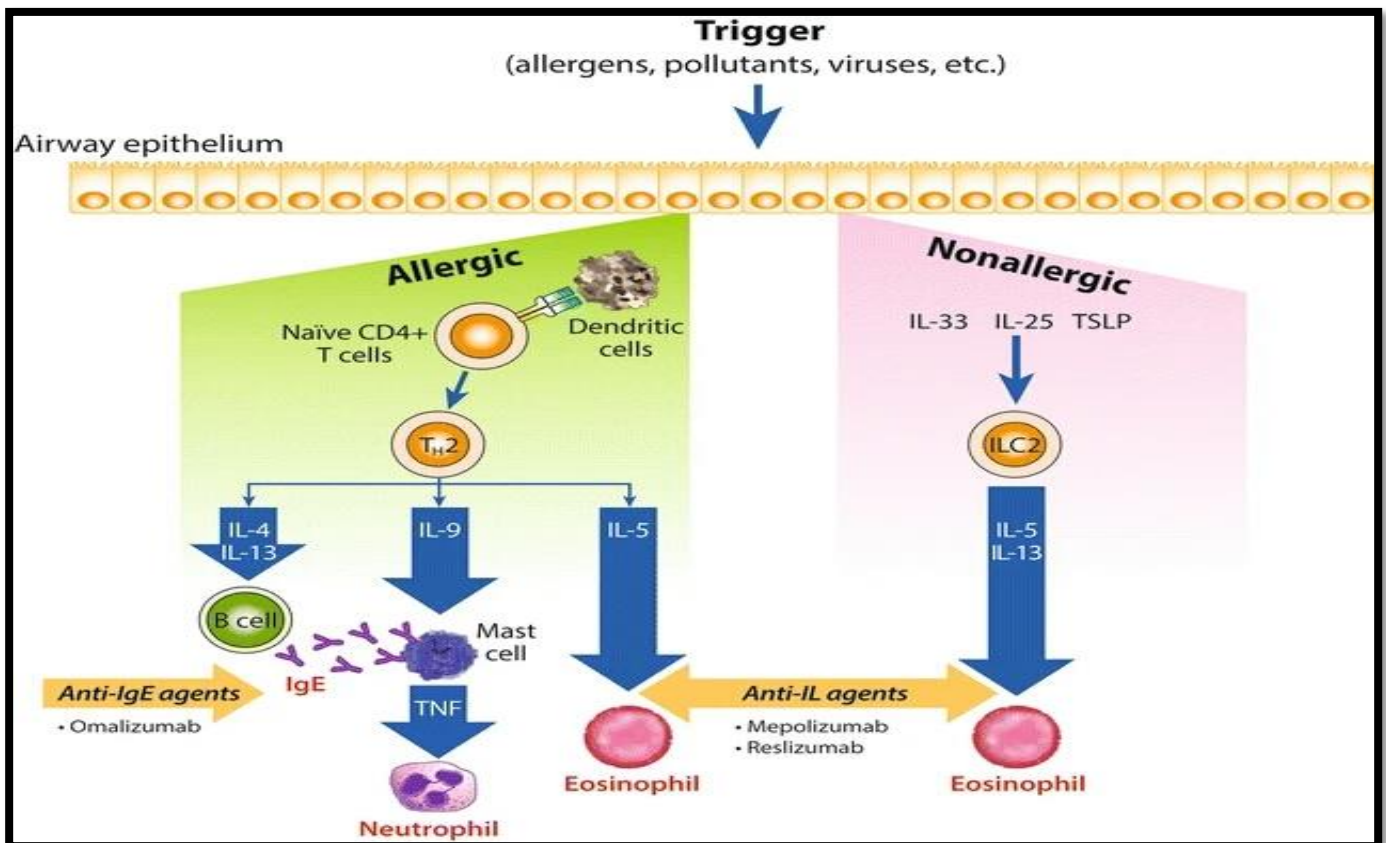


Figure 1.3. Cascade d'asthme inflammatoire allergique et non allergique. (Kim et al., 2017) IgE : immunoglobulines de type2 ; IL : interleukine ; LTh : lymphocytes T auxiliaires ; TNF : facteur de nécrose tumoral ; TSLP : lymphopoïétine stromale thymique



En présence du facteur de transcription maître GATA 3 qui régit la production de cytokine de type 2, les ILC-2 et les cellules TH2 sont les principaux régulateurs des réponses immunitaires de type 2 (Kuruvilla *et al.*, 2019).

### 1.1.7 Asthme et Microbiote intestinal :

La compréhension des complexités de l'asthme a évolué au point que les approches de la médecine de précision y compris l'analyse du microbiome sont de plus en plus reconnues comme un élément important de la gestion de la maladie d'asthme (Weronika Barcik *et al.*, 2020). La diaphonie bidirectionnelle à travers l'axe intestin-poumon est née de l'observation que différentes maladies pulmonaires peuvent être influencées par des changements du micro-environnement intestinal entraînant une hyperréactivité aux allergènes respiratoires et alimentaires (Weronika Barcik *et al.*, 2020).

Le Microbiote est un facteur important assurant les interactions différentes entre ces 2 sites dans l'asthme (Weronika Barcik *et al.*, 2020). Le microbiote comprend des bactéries, des virus des protozoaires, des champignons et des archées qui colonisent le tractus gastro-intestinal dès les premiers jours de la vie (Diego G. Peroni *et al.*, 2020).

Les patients souffrant d'asthme allergique présentent des enrichissements en bactéries des genres *Fusobacterium* et *Porphyromonas* et de la famille des *Sphingomonadaceae* et une diminution de l'abondance relative des membres de la famille des *Lactobacillales* ; les éosinophiles présents dans les expectorations de ces patients ont été associés à la présence de *Tropheryma Whipplei* (Weronika Barcik *et al.*, 2020). Pendant longtemps, le poumon a été considéré comme stérile mais de nombreuses publications ont révélé qu'il héberge son propre microbiote comportant une diversité bactérienne amoindrie chez les sujets asthmatiques par rapport aux sujets sains (Karin HuFnaagl *et al.*, 2020).

La dysbiose causée par les facteurs liés au mode de vie et aux expositions environnementales et la dérégulation subséquente des processus immunologiques liés au microbiote entraîne l'apparition de cette maladie, ses caractéristiques cliniques et ses réponses aux traitements (Weronika Barcik *et al.*, 2020).

Des études récentes montrent que les enfants qui grandissent dans un environnement agricole et sont exposés à diverses communautés microbiennes depuis le début de leur vie ont une incidence plus faible d'allergies ((Diego G. Peroni *et al.*, 2020).

D'autres études cliniques associées à de nouvelles thérapies devraient envisager des analyses du microbiome et des métabolites pour déterminer si les caractéristiques du microbiome sont en corrélation avec les réponses au traitement (Weronika Barcik *et al.*, 2020)

D'autres modèles cliniques soutiennent le rôle protecteur des bactéries contre l'inflammation allergique des voies respiratoires (Diego G. Peroni *et al.*, 2020).

C'est pour cela, des efforts sont entrepris pour reconstituer le microbiote et l'équilibre immunitaire par des probiotiques et des bactéries modifiées, mais les résultats d'études humaines ne confirment pas encore leur efficacité dans la prévention ou le traitement de l'asthme ( Karin HuFnagl *et al.*, 2020).

Les caractéristiques des interactions hôte – microbiote chez les enfants asthmatiques favorisent les crises d'asthme et peuvent permettre de définir des endotypes d'asthme (Stéphanie Lejeune *et al.*, 2020) .

Pour terminer, devient vraiment clair que le diagnostic et le traitement futur des patients asthmatiques devraient être assistés par l'analyse de la composition et de l'activité métabolique de microbiome humain (Weronika Barcik *et al.*, 2020).

## 1.2 Interféron gamma

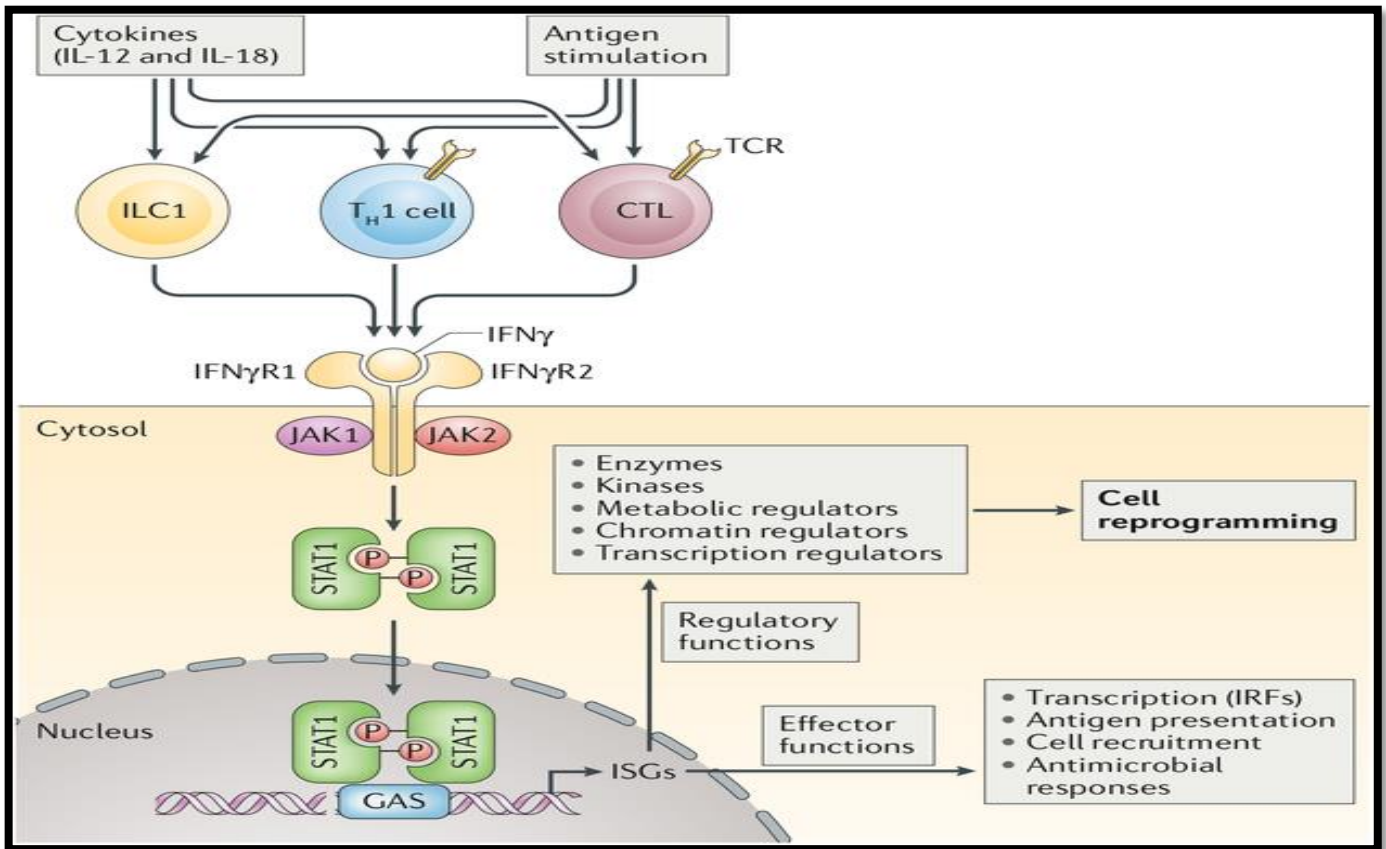
### 1.2.1 Définition

Interféron gamma (IFN $\gamma$  ou IFN gamma ou IFNG), une cytokine pro-inflammatoire majeure aurait également joué un rôle important dans la régulation des réponses immunitaires et la défense de l'hôte (Al-Mohaya *et al.*, 2016a). L'IFN $\gamma$  est une cytokine dimérisée soluble hélicoïdale de classe II, sa forme biologique active est formé par l'interverrouillage antiparallèle du monomère IFN-gamma ( un monomère IFN $\gamma$  est constitué de six hélices alpha et d'une région C terminal étendue ); (Bhat *et al.*, 2018; Savan *et al.*, 2009). Elle est libérée en quantité importante par les cellules du système immunitaire (les populations de lymphocytes de type inné et les cellules immunitaires adaptatives) ; dans les cellules immunitaires adaptatives comme les LTh1 et LTCD+8 (CTL) la production soutenue d'IFN $\gamma$  nécessite une reconnaissance médiée par le TCR. En revanche, dans les lymphocytes de type inné y compris les cellules NK et les ILC. Sa production est induite par des cytokines notamment IL-12 et IL-18 (Ivashkiv, 2018); Ford *et al.*, 2001). L'IFNG est un modérateur clé de l'immunité, joue un rôle important dans l'homéostasie tissulaire et l'immunosurveillance tumorale ; (Bhat *et al.*, 2018; Ivashkiv, 2018).

### 1.2.2 Signalisation de l'interféron gamma :

La signalisation de l'IFN $\gamma$  a été définie comme une cascade d'événements de phosphorylation de la tyrosine (Ivashkiv, 2018). Cette voie est coordonnée par des molécules intracellulaires y compris les Janus Kinases ( JAK), le transducteur de signal et l'activateur des protéines de transcription ( STAT) qui sont à leur tour régulés négativement par les inhibiteurs de protéines de la STAT activé ( PIAS) et les suppresseurs de la signalisation des cytokines (SOCS) et les facteurs de régulation de l'IFN ( IRF : IRF3, IRF7, IRF4, IRF8, IRF9 ) ( Figure 4) (Secombes and Zou, 2017).

La figure 1.4 représente la voie de signalisation induite par l'IFNG.



**Figure 1.4 Production et signalisation d'IFN $\gamma$ .** (Ivashkiv, 2018). IFN $\gamma$  est produit par les lymphocytes de type inné, y compris les cellules lymphoïdes innées du groupe 1 ( ILC1), et par les lymphocytes adaptatifs, y compris les LTh1 et les CTL , en réponse à la stimulation des antigènes et des cytokines. L'IFN gamma agit sur son récepteur pour induire un transducteur de signal JANUS Kinase ( JAK) rapide et transitoire et l'activateur de la signalisation de transcription ( STAT) et l'induction d'un gène stimulé par l'interféron gamma (ISG). Clé : GAS : site d'activation IFN gamma ; IFN $\gamma$ R : récepteur IFN $\gamma$  ; IRF : facteur de régulation de l'interféron ; TCR : récepteur des cellules T.

### 1.2.3 IFN $\gamma$ au cours d'asthme allergique pédiatrique :

Le rôle de l'IFN $\gamma$  au cours de l'asthme allergique reste à déterminer. Dans l'asthme, des études d'hybridation in situ d'immuno-histochimie portées sur des cellules de lavage broncho- alvéolaire et des biopsies bronchiques ont montré qu'il y'avait in situ chez les malades un déficit de production d'IL-12 et d'IFN $\gamma$  et une production élevée d'IL-4 d'IL-5 et d'IL-13 (Mamessier et al., 2005). Cela peut être confirmé par le nombre diminué des cellules NK dans l'asthme, qui ont perdu leurs propriétés cytotoxiques essentielles et aussi par l'augmentation du nombre de leucocytes dans les voies aériennes des asthmatiques. Ceci suggère que les cellules NK peuvent intervenir dans la résolution de l'inflammation allergique induite par les TH2 des bronches.

Plus récemment, des travaux ont constaté qu'un déséquilibre entre les cytokines TH1 et TH2 joue un rôle important dans l'augmentation du risque d'asthme (Lee et al., 2019). Au niveau des voies respiratoires, un nombre de cellules TH1 productrices d'IFN $\gamma$  a été détecté, cette cytokine a inhibé l'éosinophilie, le développement de l'hyperréactivité des voies respiratoires et l'hyperplasie des cellules calciformes induite par l'IL-13, produit de la voie TH2. Cependant, une thérapie avec l'IL-12, une

cytokine induisant TH1 seule n'a pas réussi à inhiber ou réduire l'hyperréactivité des voies aériennes chez les sujets asthmatiques (Ford *et al.*, 2001).

Ces données renforcent en plus l'idée que la maladie d'asthme implique des interactions coopératives entre les cytokines pro-inflammatoires TH1 et anti-inflammatoires TH2/(Kumar *et al.*, 2006).

### 1.3 Le gène IFNG et PCR

#### 1.3.1 Description

Les gènes de l'IFN possèdent une organisation génétique qui peut varier soit par fusion donc la perte d'un exon/intron, soit par l'apparition de gènes introns par des événements de rétrotransposition (Secombes and Zou, 2017). Le gène IFNG est parmi les gènes immunorégulateurs les plus clonés, joue un rôle clé dans la clairance des agents pathogènes et la surveillance des tumeurs (Savan *et al.*, 2009).

Le gène codant pour la protéine IFN gamma est localisé sur le chromosome 12q15-q24 se compose de 4 exons/3 introns couvrant 5.4 Kb (Figure5) ; et pour les gènes récepteurs IFN $\gamma$ R1 et IFN $\gamma$ R2 sont situés sur le chromosome 6q23-q24 et 21q22.11 respectivement (Figure6) (Bhat *et al.*, 2018; Dwivedi *et al.*, 2013; Philpott *et al.*, 2010; Savan *et al.*, 2009).

La figure 1.5 indique la localisation chromosomique du gène IFNG.

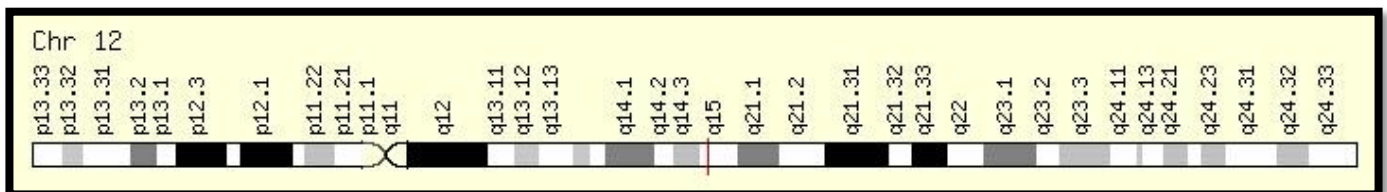


Figure 1.5. La localisation chromosomique du gène IFNG .

La figure 1.6 indique la localisation chromosomique des gènes récepteurs IFNGR1 et IFNGR2 respectivement

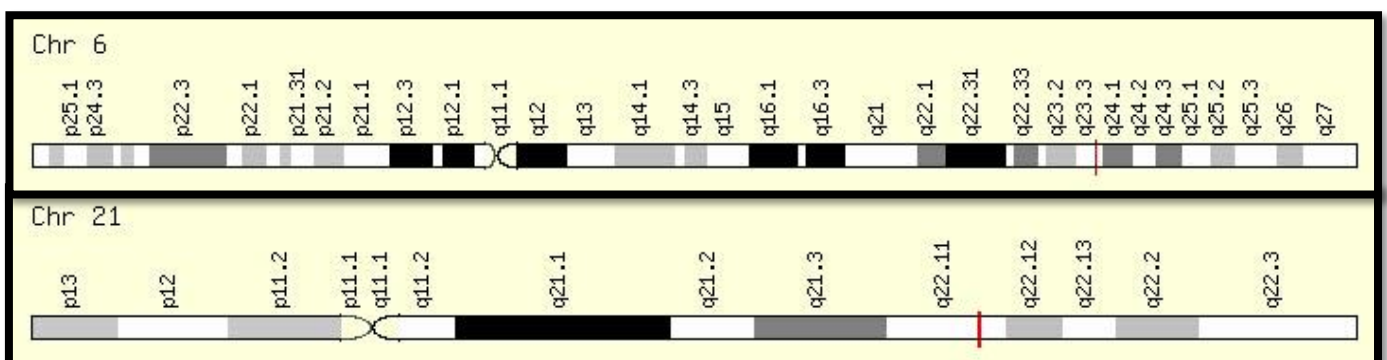


Figure 1.6. La localisation chromosomique des gènes récepteurs IFNGR1 et IFNGR2.

T bet , GATA3 , NF kappa B , CREB et STATs sont présents au niveau de la région promotrice proximale de l'IFNG humain ainsi que des microsatellites dinucléotidiques(CA) dans le premier intron du gène IFNG humain, la traduction et la transcription de l'IFNG sont régulées par de nombreux facteurs ciblant le promoteur et les régions non traduites, notamment la région IFN $\gamma$ 3' ( 3' UTR ) d'ARNm contient plusieurs segments d'adénosine- uridine à action cis ( AUUUA ), appelés éléments riches en AU (ARE) ; qui déstabilisent l'ARNm par le processus de désingratiion médié par ARE(Savan et *al.*, 2009).

### 1.3.2 Polymorphismes du gène humain IFNG

Le degré d'expression des cytokines dépend en plus de l'intensité de la stimulation, des facteurs génétiques de l'hôte tels que les SNP des régions non traduites, codantes et régulatrices ; les SNP dans les régions codantes peuvent influencer sur l'activité biologique de la cytokine produite tandis qu'une SNP dans le promoteur et/ ou dans les régions non traduites affecte l'expression du gène lui-même, ce qui explique l'augmentation du développement d'une maladie humaine liée à des polymorphismes(Popadic et *al.*, 2012). Plusieurs mécanismes de fonctionnalité du SNP sont présents dans les gènes des cytokines, notamment : variantes de promoteurs distaux(IL-6, IL-8 ),les changements d'acides aminées (IL-6R, IL-13, IL-1alpha) , le saut d'exon ( IL-7R alpha) et les variantes de promoteurs proximaux ( IL- 1beta ,IL-Ra , IL-2, IL-13, TNF et IFN $\gamma$ )(Smith and Humphries, 2009). La région codante IFNG est invariante sans polymorphisme signalé. Cependant , des études indiquent qu'il existe 2 SNP dans la région non codante de ce gène au niveau du l'intron 1 : ( **+874A/T polymorphisme( rs 2430561 )** ; **microsatellite CA( rs 3138557 )**)(Dwivedi et *al.*, 2013).

Le SNP ( rs 2430561 ) du gène IFNG en position 874 est situé dans un site de liaison putatif du facteur nucléaire kappa B (NF- $\kappa$ B) ; a montré des associations avec la sensibilité aux maladies inflammatoires(AI-Mohaya et *al.*, 2016; Popadic et *al.*, 2012). Compte tenu de rôle majeure de l'IFNG dans les réponses inflammatoires, le génotypage des polymorphismes du ce gène peut être une solution évidente pour prédire la susceptibilité individuelle au développement de certaines maladies inflammatoires.

### 1.3.3 Réaction en chaîne par polymérase ( PCR )

La réaction en chaîne par polymérase( PCR) est un test enzymatique très sensible et simple, permettant l'amplification rapide d'un fragment d'ADN spécifique à partir d'un pôle complexe d'ADN (Garibyan and Avashia, 2013) .

Il existe deux méthodes courantes utilisées pour détecter et quantifier le produit d'ADN : la PCR qualitative est à utiliser lorsque la PCR est effectuée pour identifier un pathogène ou pour le clonage, tandis que la deuxième méthode la qRT-PCR permet à la fois la détection et la quantification du produit en temp réel (Garibyan and Avashia, 2013) .

#### 1.3.3.1 Principe du PCR :

En utilisant l'ADN source de tissus et d'organismes, y compris le sang périphérique, les cheveux, la peau, le salive et les microbes ; on peut effectuer une PCR (Garibyan and Avashia, 2013).

Cette technique d'amplification peut générer un approvisionnement suffisant d'un segment d'ADN à partir d'ADN matrice, d'ADN polymérase, d'amorces et des nucléotides (Figure 7) (Lorenz, 2012).

- Les nucléotides : comprennent 4 bases ( Adénosine A , Guanine G , Cytosine C et Thymine T) qui sont utilisées par l'ADN polymérase pour créer le produit de PCR résultant
- L'ADN polymérase : enzyme qui relie les nucléotides
- Les amorces qui sont utilisées spécifient le produit d'ADN exact à amplifier ; une amorce doit recourir au brin plus qui par convention est orienté dans la direction  $5' \rightarrow 3'$  ( brin sens) et l'autre amorce doit compléter le brin négatif  $3' \rightarrow 5'$  ( anti- sens), avec une longueur de 15 à 30 résidus nucléotidiques avec une teneur optimale en GC se situe entre 40 et 60% et des températures de fusion optimales (  $T_m$ ) se situe entre  $52$  et  $58$   $^{\circ}\text{C}$  ; ceux-ci servent de point d'extension sur lequel l'ADN polymérase peut s'appuyer (Lorenz, 2012).

La figure 1.7 représente le principe de la PCR .

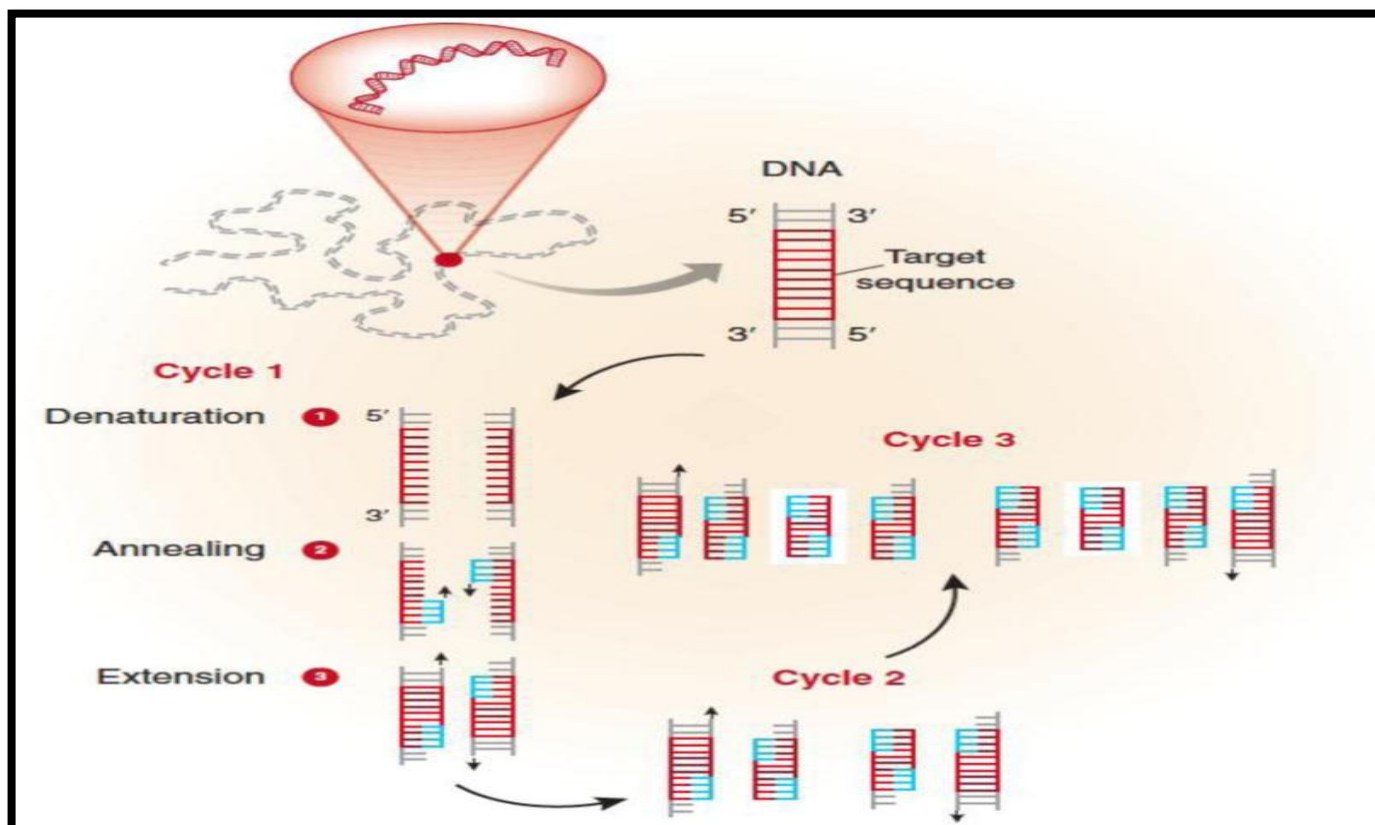


Figure 1.7. Présentation schématique du principe PCR. (Garibyan and Avashia, 2013a)

Tous ces composants sont mélangés dans un tube à essai ou une plaque à 96 puits puis placés dans un thermocycleur, où la solution réactionnelle est chauffée au-dessus du point de fusion des 2 brins d'ADN ( processus de dénaturation ) ; la température est abaissée pour permettre aux amorces de se lier aux segments d'ADN cibles ( processus d'hybridation), en augmentant la température autre fois pour que l'ADN polymérase puisse étendre les amorces en ajoutant des nucléotides au brin d'ADN en développement (Garibyan and Avashia, 2013).

### 1.3.3.2 Analyse des produits PCR :

Afin de visualiser les produits de PCR , il existe 2 méthodes principales : (1) étiquetage des nucléotides/ amorces avec colorants fluorescents ( fluorophores) mais avant l'amplification par PCR ou (2) coloration du produit d'ADN amplifié avec un colorant chimique tel que le bromure d'éthidium qui s'intercale entre les deux brins duplex ; mais la méthode la plus utilisée pour l'analyse de produit de PCR est l'électrophorèse sur gel d'agarose qui sépare les produits d'ADN en fonction de la taille et la charge(Garibyan and Avashia, 2013).

### problématique

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique. Elle est définie par deux formes cliniques : l'asthme non allergique et l'asthme allergique, qui se caractérise par une inflammation éosinophilie et une réponse immunitaire Th2. Cela fait l'hypothèse qu'une déviation vers une réponse Th1 puisse protéger contre l'asthme , puisque les cellules Th1 sécrétrices d'IFNG antagonisent les fonctions des cellules Th2 en agissant sur l'expression des gènes par la perturbation de plusieurs boucles de rétroactions anti-inflammatoires telles que ceux médiées par STAT3.

Cependant, l'intervention de l'IFNG comme puissant inducteur de phénotype de type1 pro-inflammatoire au cours de l'asthme allergique reste à clarifier. C'est pour cela l'étude du gène IFNG permettra de mettre en lumière l'expression et la régulation de cette cytokine en réalisant différentes techniques notamment la PCR.

Cette méthode utilisée pour amplifier l'ADN d'intérêt peut être influencée par de nombreuses conditions notamment la conception d'une bonne paire d'amorces.

### Objectif

Réaliser le processus de la conception d'amorces spécifiques du gène IFNG pour arriver au succès d'une expérience PCR plus tard.

### But

Concevoir une bonne paire d'amorces spécifique du gène IFNG pour améliorer du pouvoir sur l'expression de ce gène au cours de certaines maladies inflammatoires chroniques notamment l'asthme allergique.

## 2.1 La conception des amorces

Le choix des amorces est le facteur le plus critique pour déterminer la sensibilité et la spécificité de tout test PCR ; par conséquent une mauvaise conception est capable d'entraîner une détection négative de la cible

Le processus de la conception des amorces pour le gène IFNG passe par plusieurs étapes.

## 2.2 Le flux de travail pour concevoir une paire d'amorces pour le gène IFNG

### 2.2.1 L'identification de la cible IFNG (Séquence)

Faut d'abord accéder à la base de données « Ensembl »

Figure2.1 : La base de données « Ensembl.org »

Il existe un problème avec la recherche de séquences de l'amplicon car on peut trouver de nombreuses séquences identiques, c'est pour cela il faut accumuler autant d'informations sur la cible d'amplification notamment la localisation chromosomique, la transcription individuelle et le symbole.



Une recherche pour le gène IFNG fait apparaître 1180 séquences identiques.

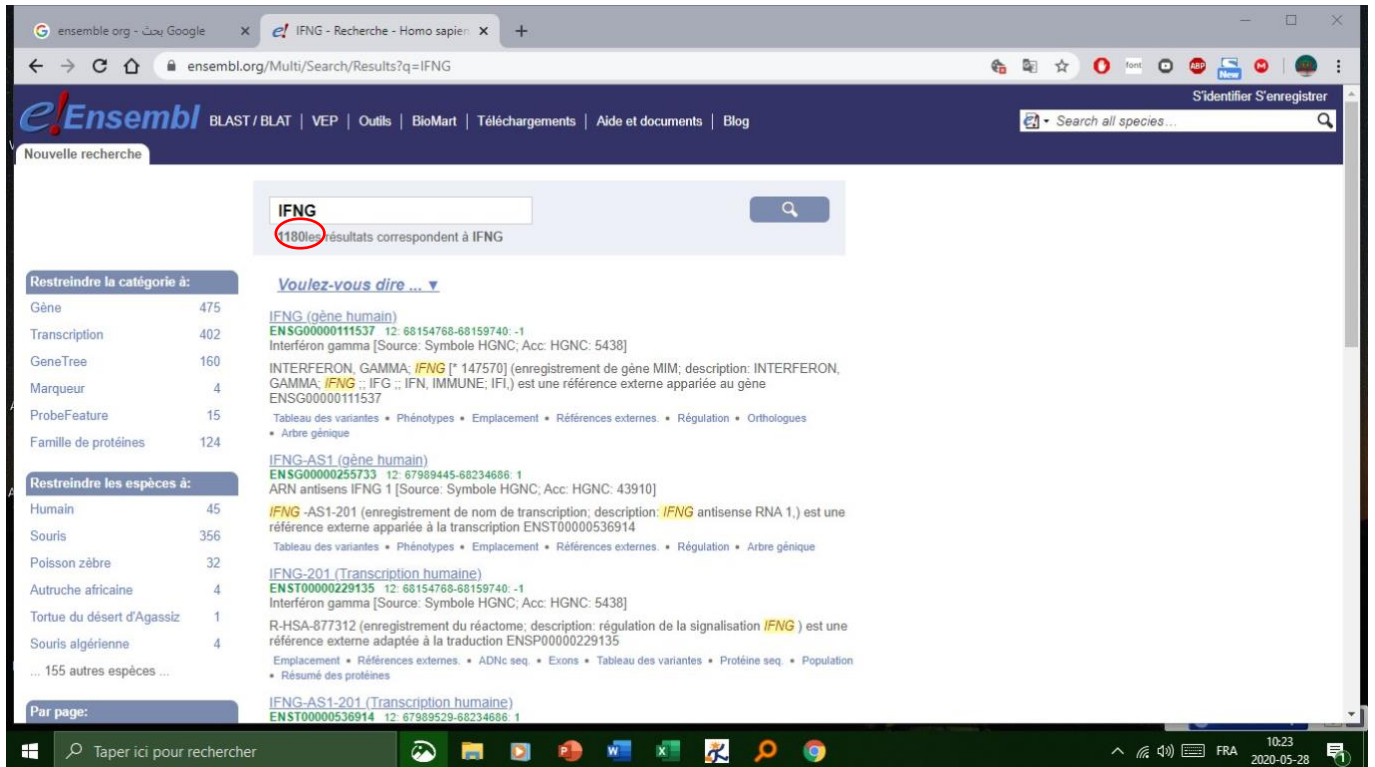


Figure2.2 : Recherche de séquences du gène IFNG.

Le gène IFNG est localisé sur le chromosome 12 et est composé de 4 introns et 3 exons.

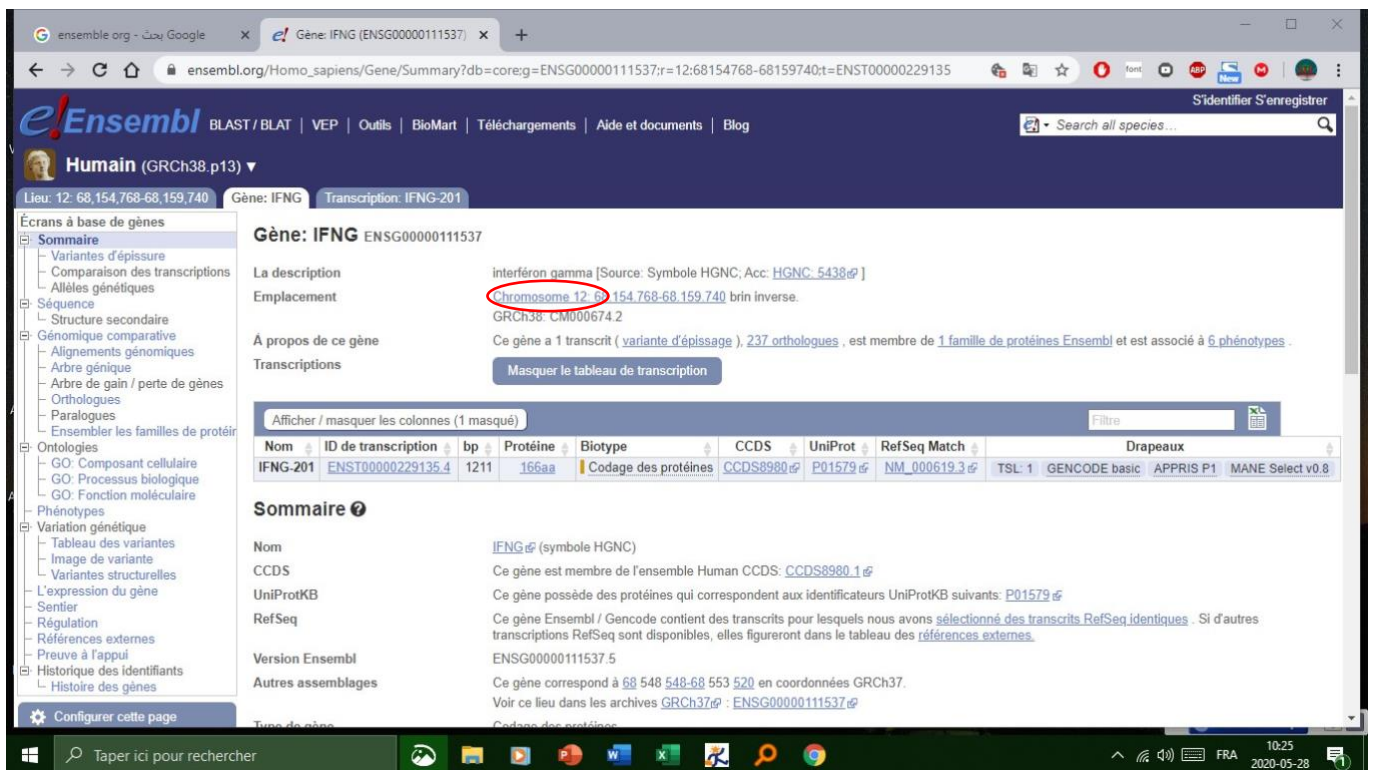


Figure2.3. Le choix de la cible IFNG

Maintenant, nous pouvons obtenir la séquence recherchée pour le gène IFNG : les exons sont indiqués en rouge.

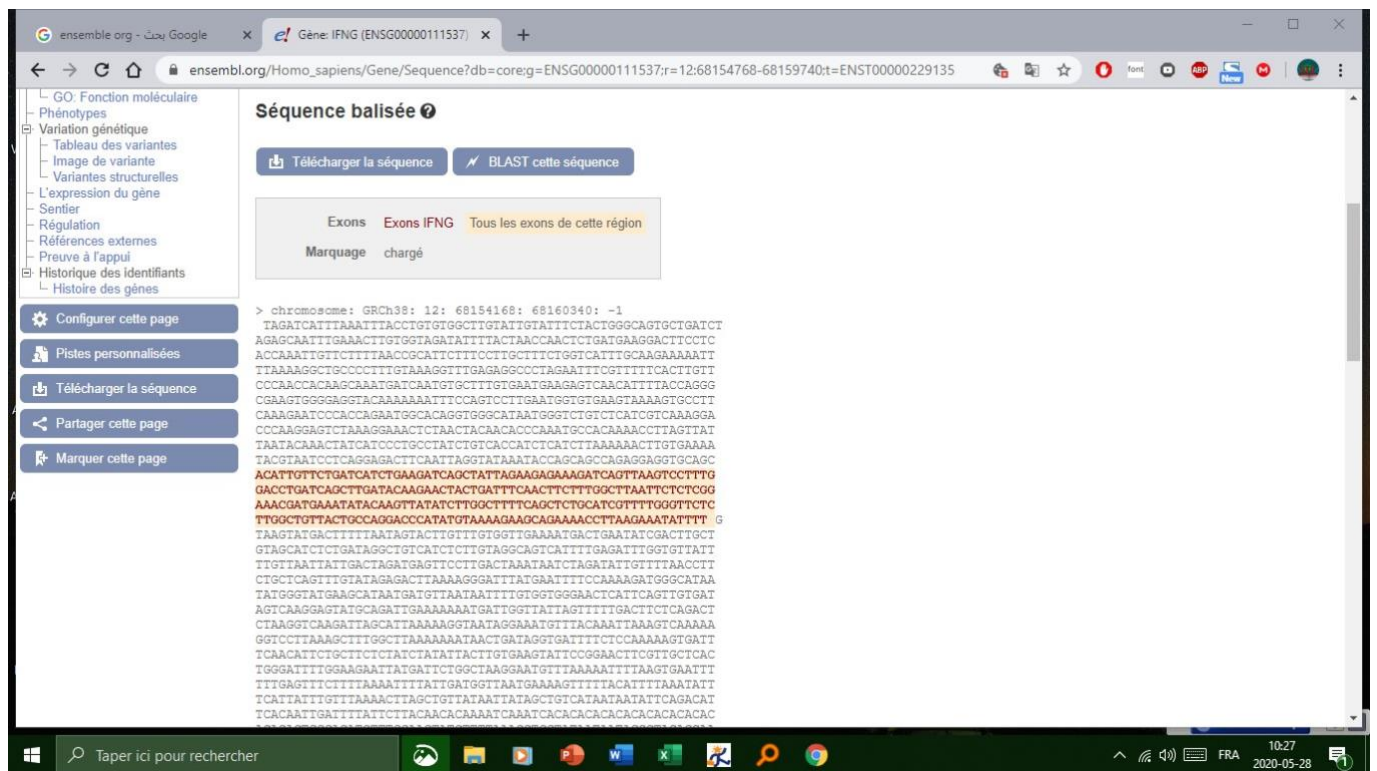


Figure2.4. Séquence du gène IFNG.

### 2.2.2 Primer Blast

L'outil Primer Blast est accessible à [http : // www. ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/) pour tous les utilisateurs permettant de concevoir des amorces basées sur la structure exon / intron spécifiques à une cible

Les étapes de l'outil Primer-Blast sont présentées dans les figures ci-dessous :

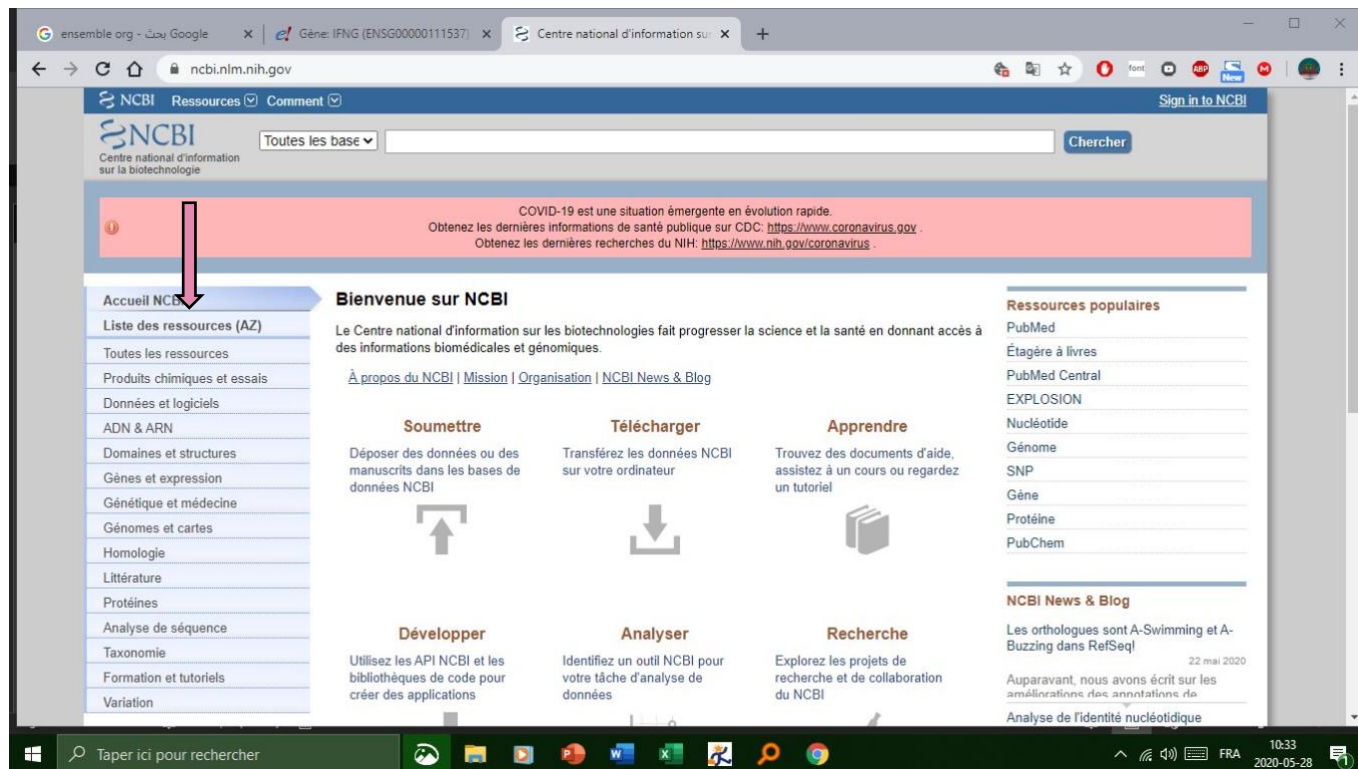


Figure2.5

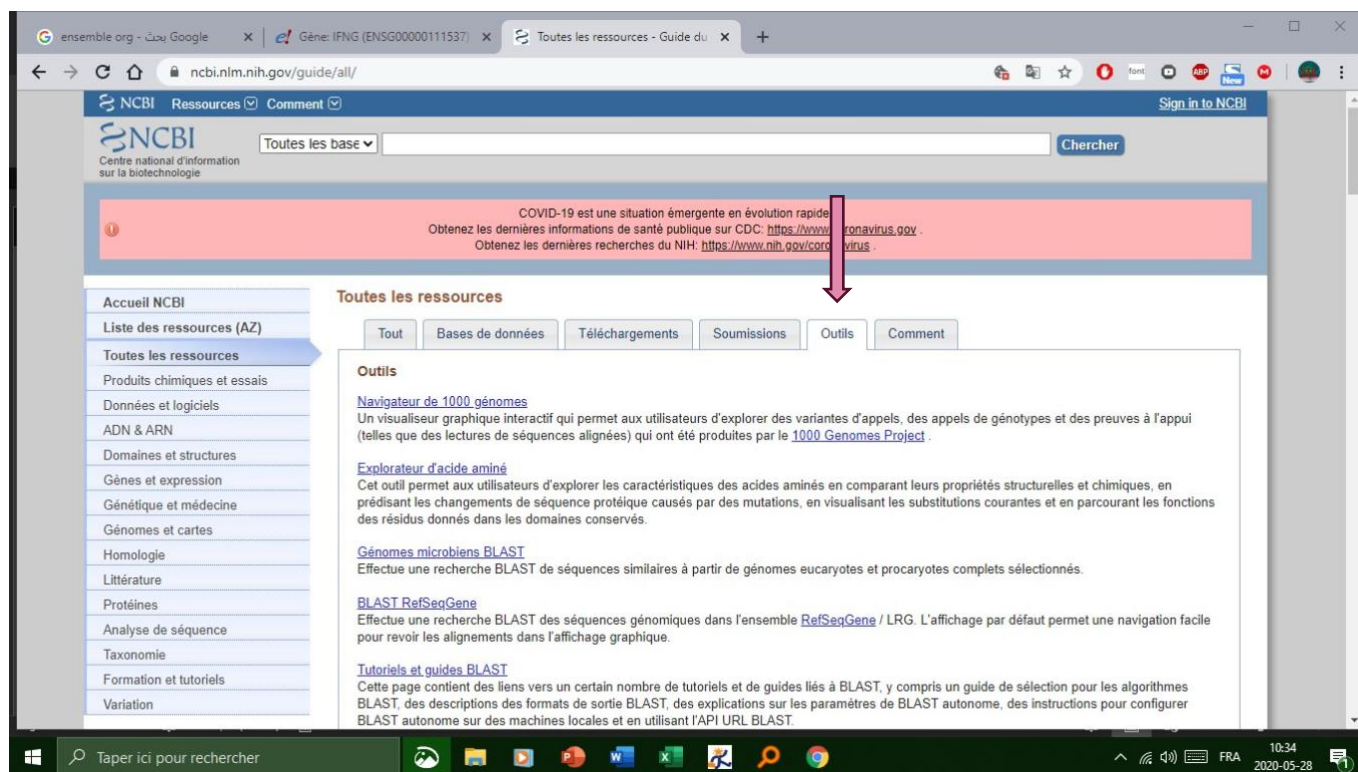


Figure2.6

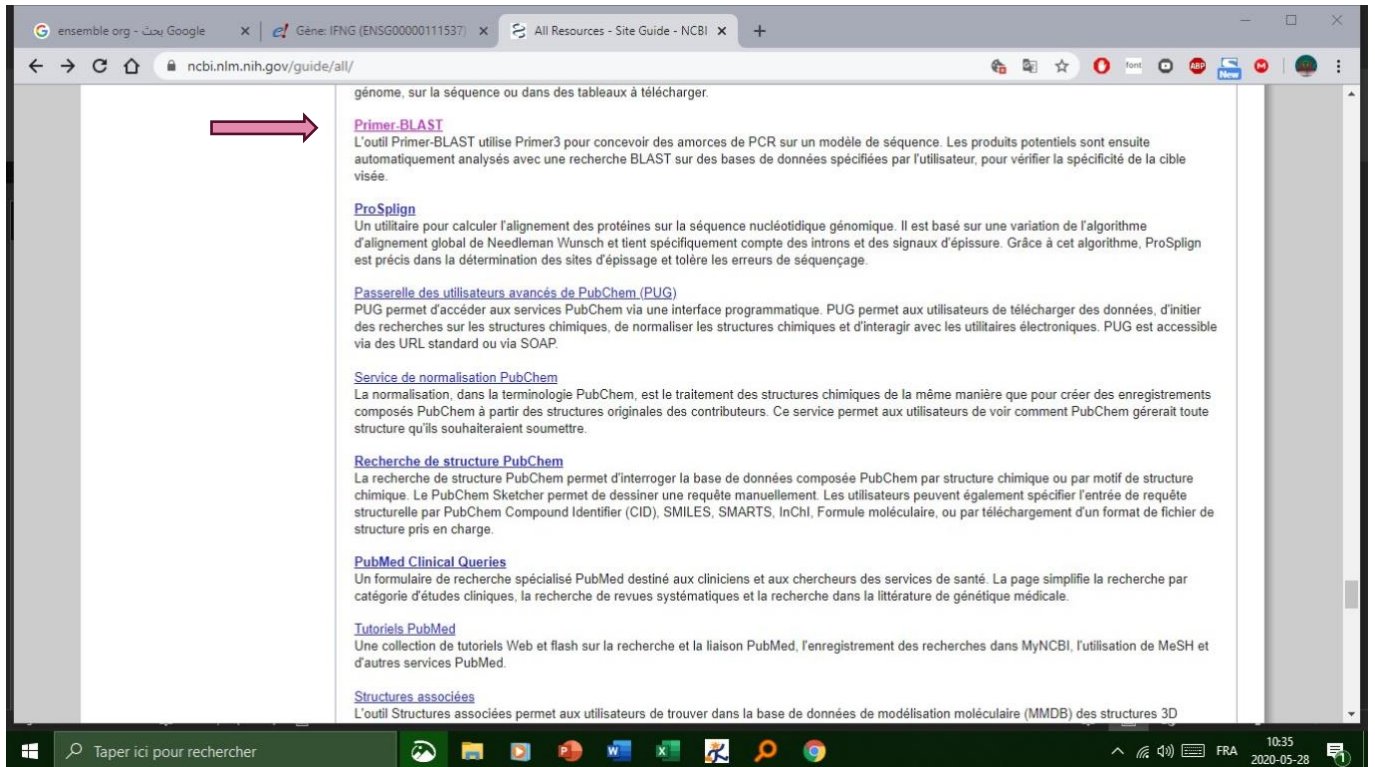


Figure2.7

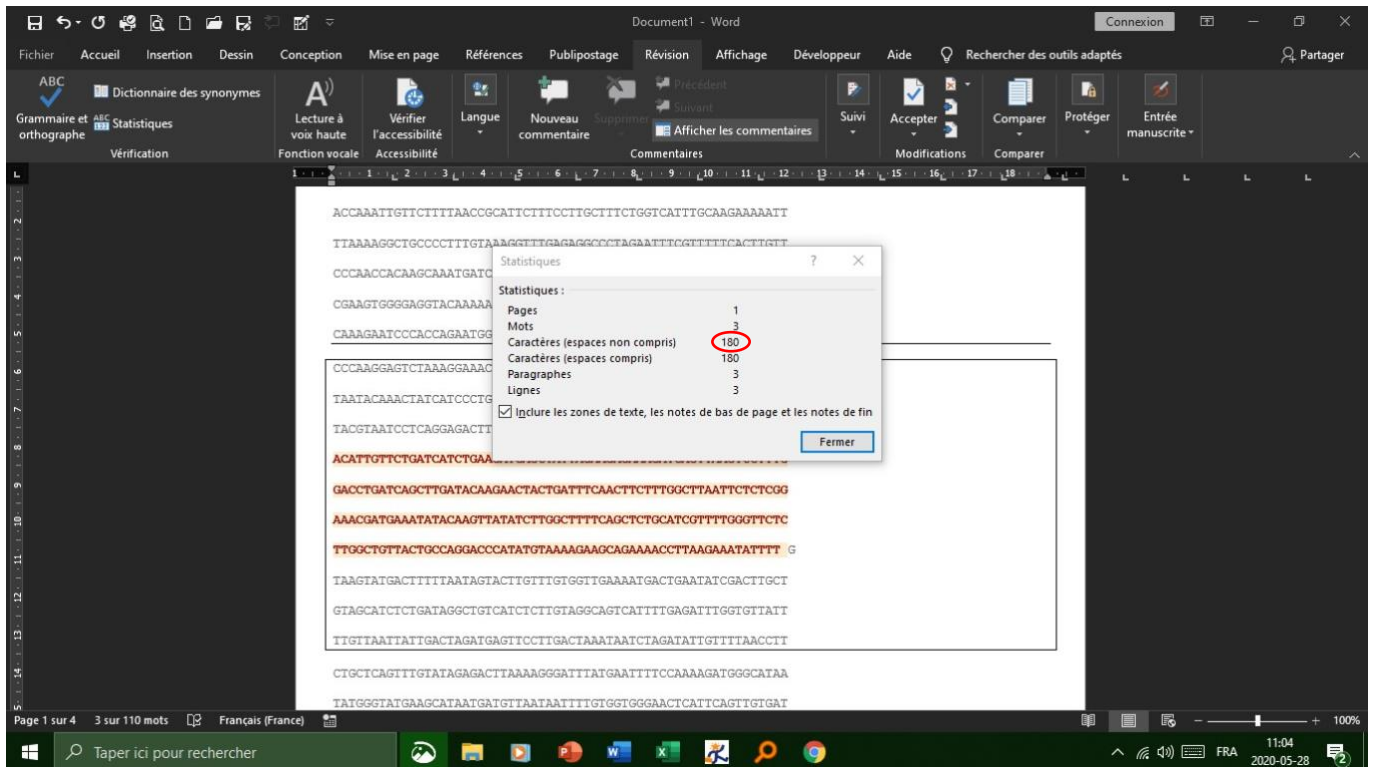


Figure 2.8

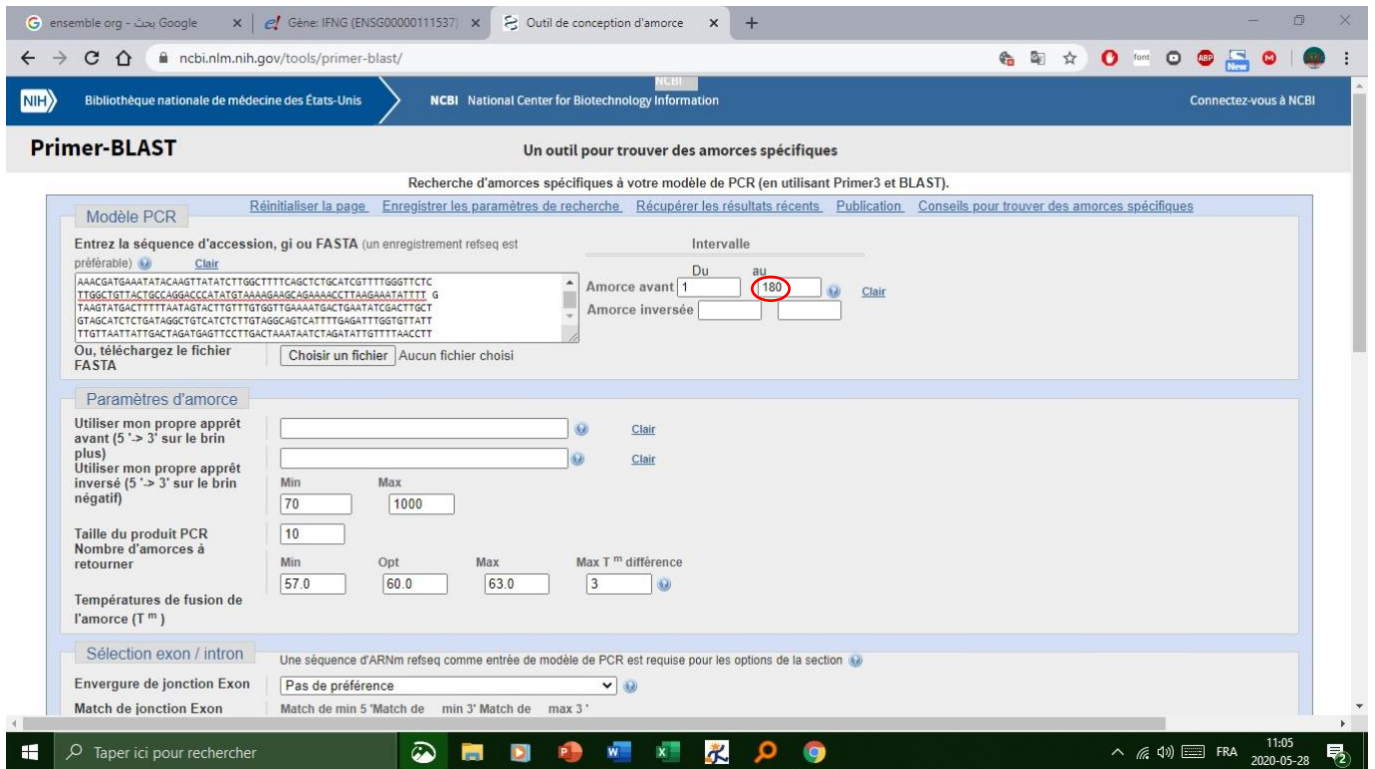


Figure2.9

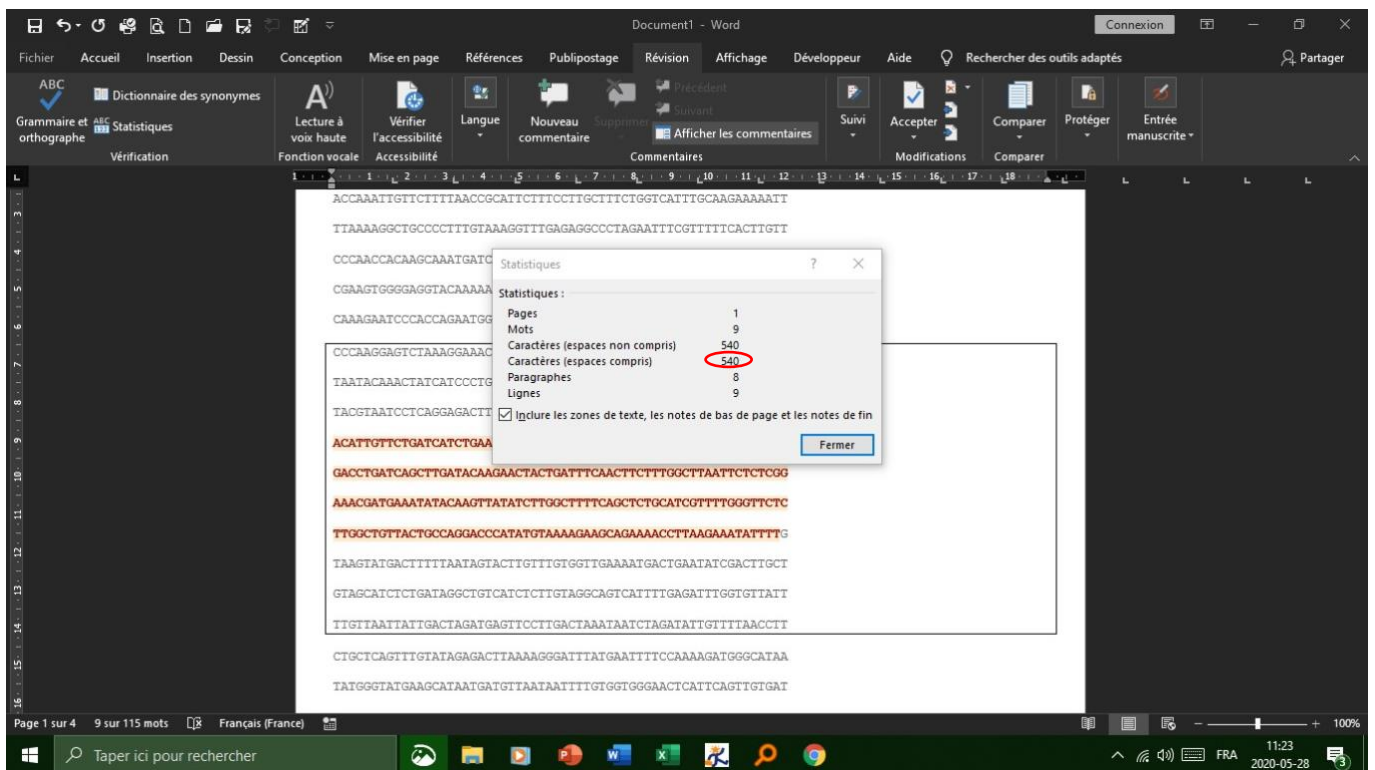


Figure2.10

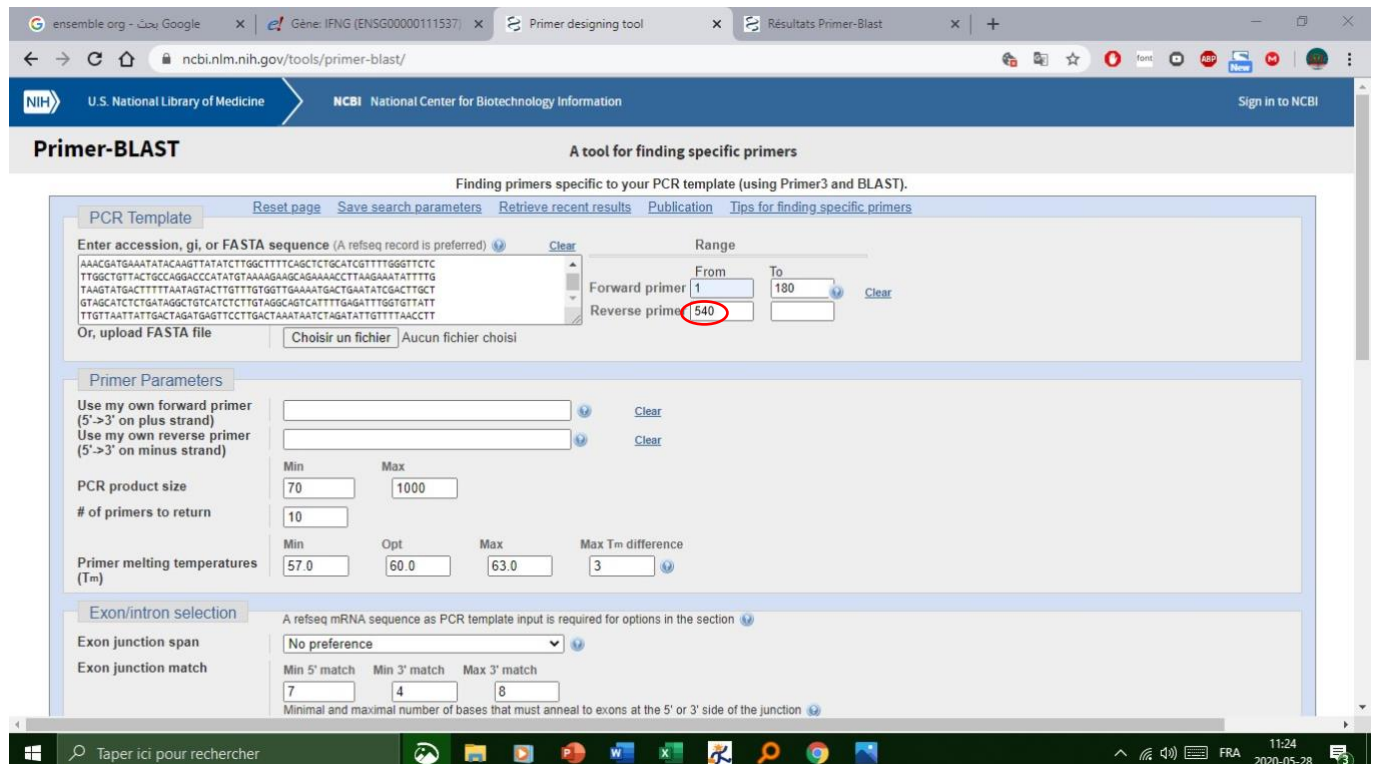


Figure2.11

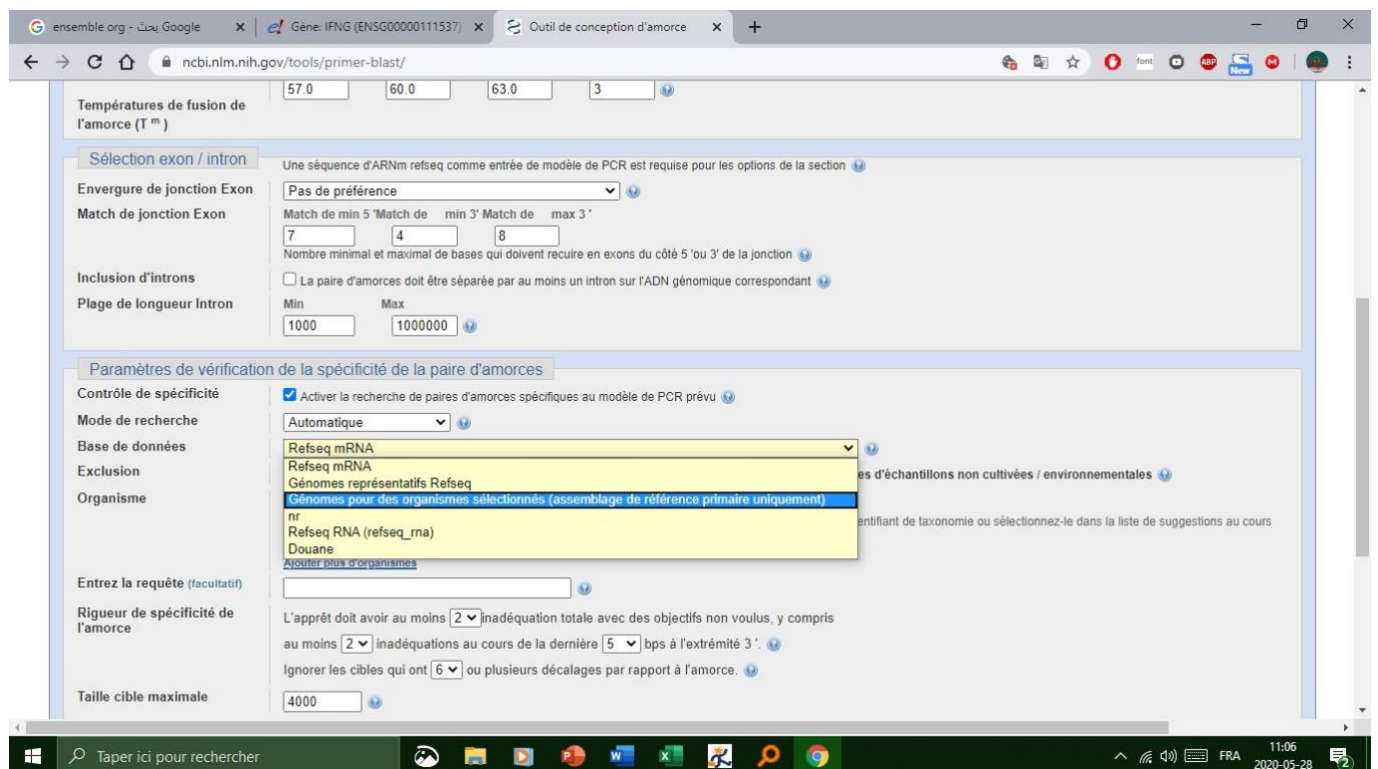


Figure2.12

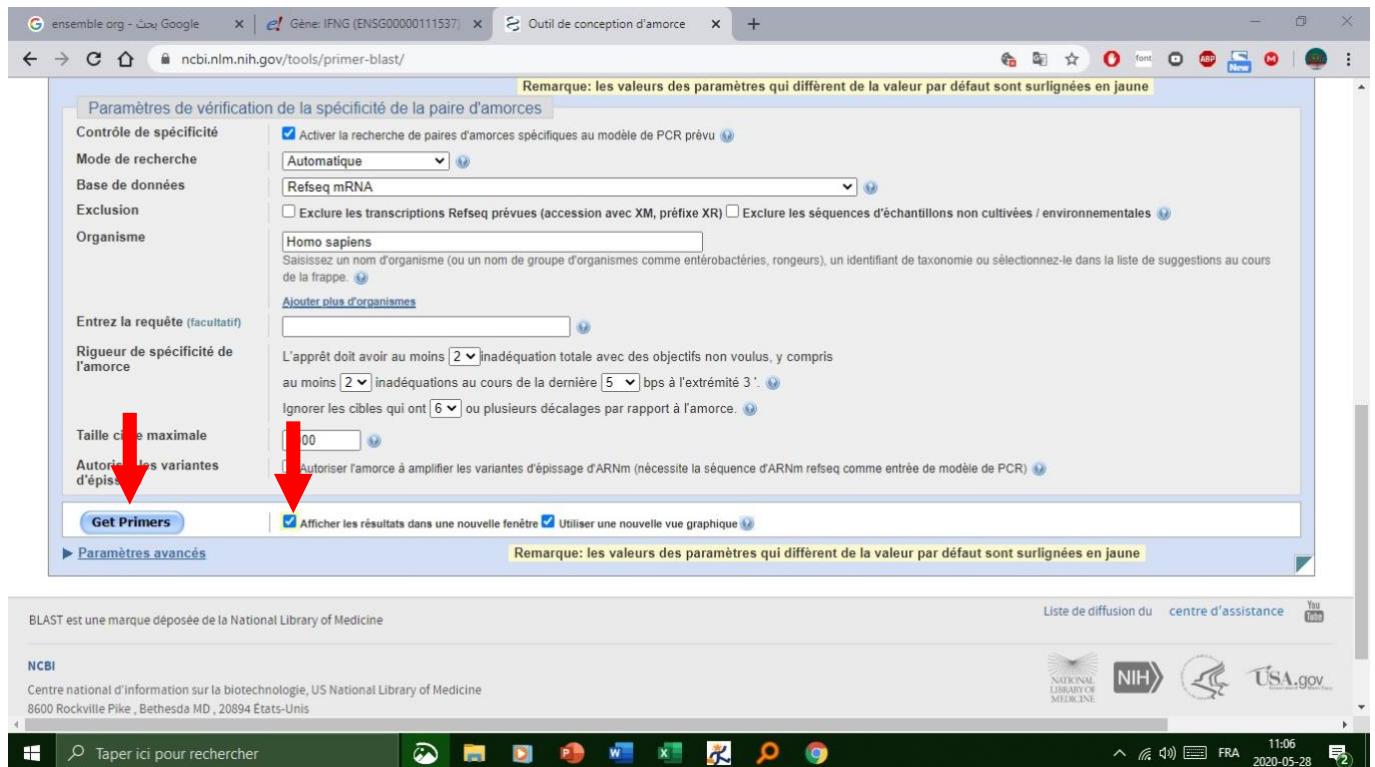


Figure2.13

Ces dernières figures représentent les principales étapes à suivre au cours de la conception d'amorces à l'outil Primer Blast.

### 2.3 L'analyse des résultats

Plusieurs critères doivent être pris en considération lors du choix de la bonne paire d'amorces.

- Les amorces du gène IFNG doivent être au début et à la fin du ce gène
- Une paire d'amorces doit avoir une forte spécificité de la cible qu'on sert à amplifier : étant donné que les chromosomes peuvent partager des régions nucléotidiques homologues, il est possible que ces amorces destinées à une cible se lient à une autre mais d'une manière non spécifique( des produits aspécifiques)

Les amorces doivent avoir une longueur doit être entre 20 et 25 nucléotides

Il faut que l'amorce contienne un bon pourcentage en GC au niveau de 3'

La température de fusion  $T_m$  calculée par les programmes de la conception d'amorces doit être similaire (c'est-à-dire ne dépasse pas  $4^\circ\text{C}$  entre  $T_m$  d'amorce sense et  $T_m$  d'amorce anti-sense )

Il faut éviter l'autocomplémentarité entre les amorces si non on aura une structure d'épingle à cheveux

### 3.1 Résultats de la conception d'amorces pour le gène IFNG

Grâce à l'utilisation de l'outil Primer Blast nous avons réussi à obtenir ces résultats comme indiquent les figures ci dessous :

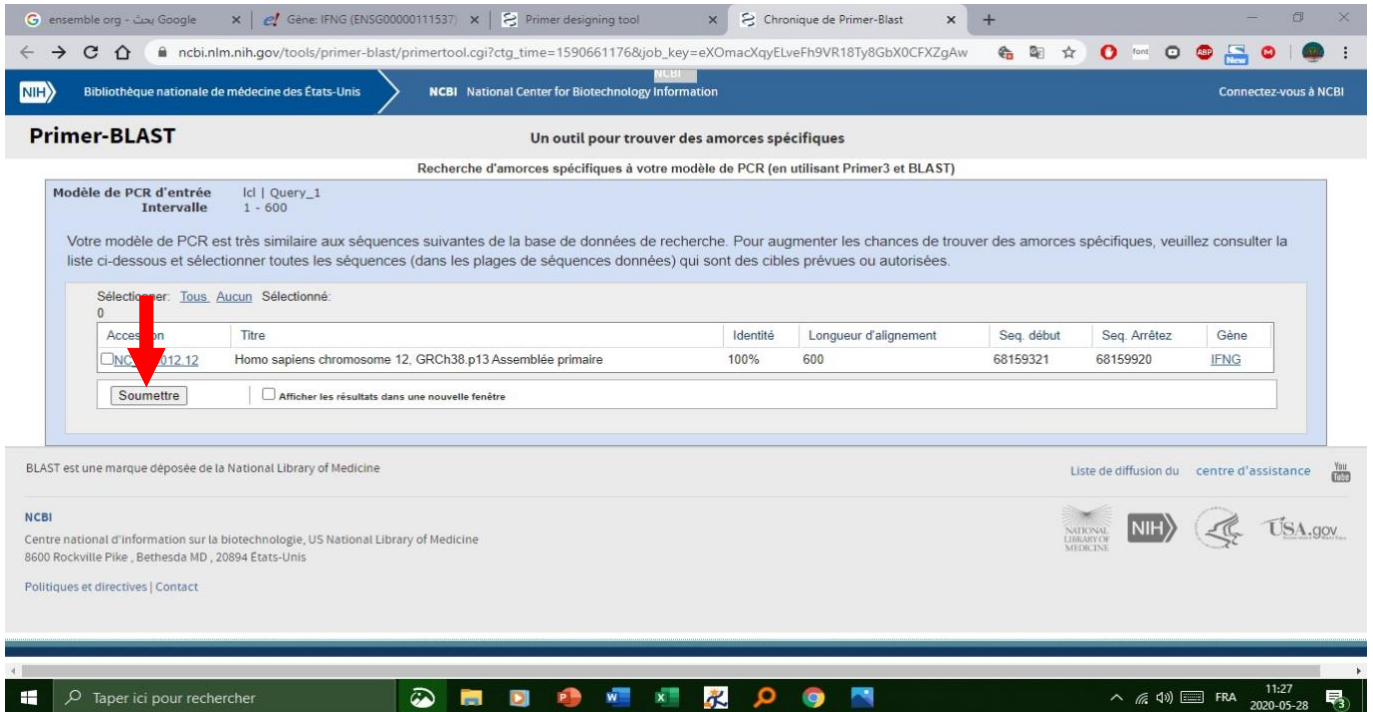


Figure3.1. Recherche des paires d'amorces spécifiques pour le gène IFNG

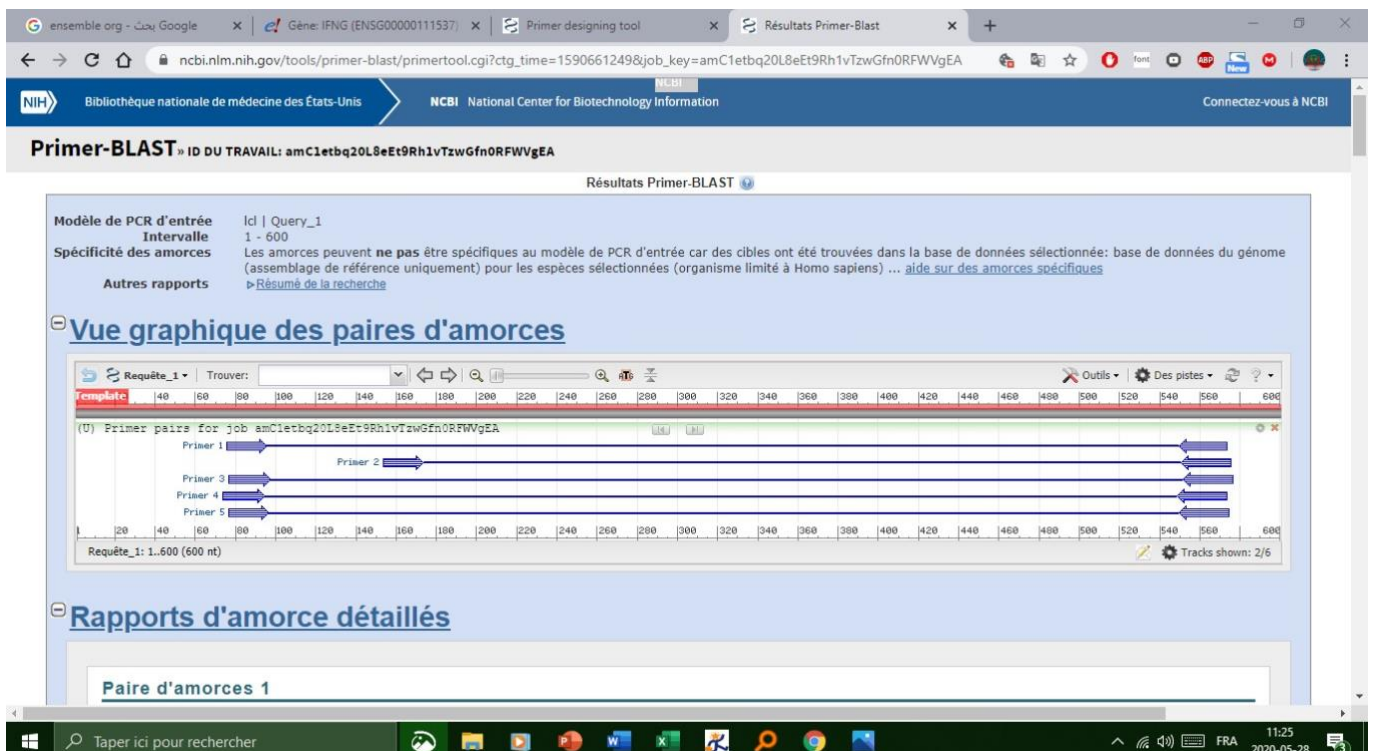


Figure3. 2. Vue graphique de la paire d'amorces choisie pour le gène IFNG



Nous avons choisi cette paire d'amorces pour les raisons suivantes :

La PCR n'amplifie pas les produits au-delà de 1000 Pb. En effet des produits de PCR de plus de 1000 pb pourraient être difficiles à amplifier, la concentration d'ADN devenant un facteur limitant. En plus, un produit de PCR est long et sa concentration doit être élevée pour obtenir un bon résultat d'amplification.

La température d'hybridation des amorces est de 60°C, une température à 59.96° C et 5,13 ° C donne de meilleurs résultats (Figure 3.2)

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

Un facteur important qui est la teneur en GC d'une amorce qui doit être comprise entre 40 et 60, cette paire d'amorces possède une teneur en GC de 55% et 37.5% pour l'amorce sens et antisens respectivement.

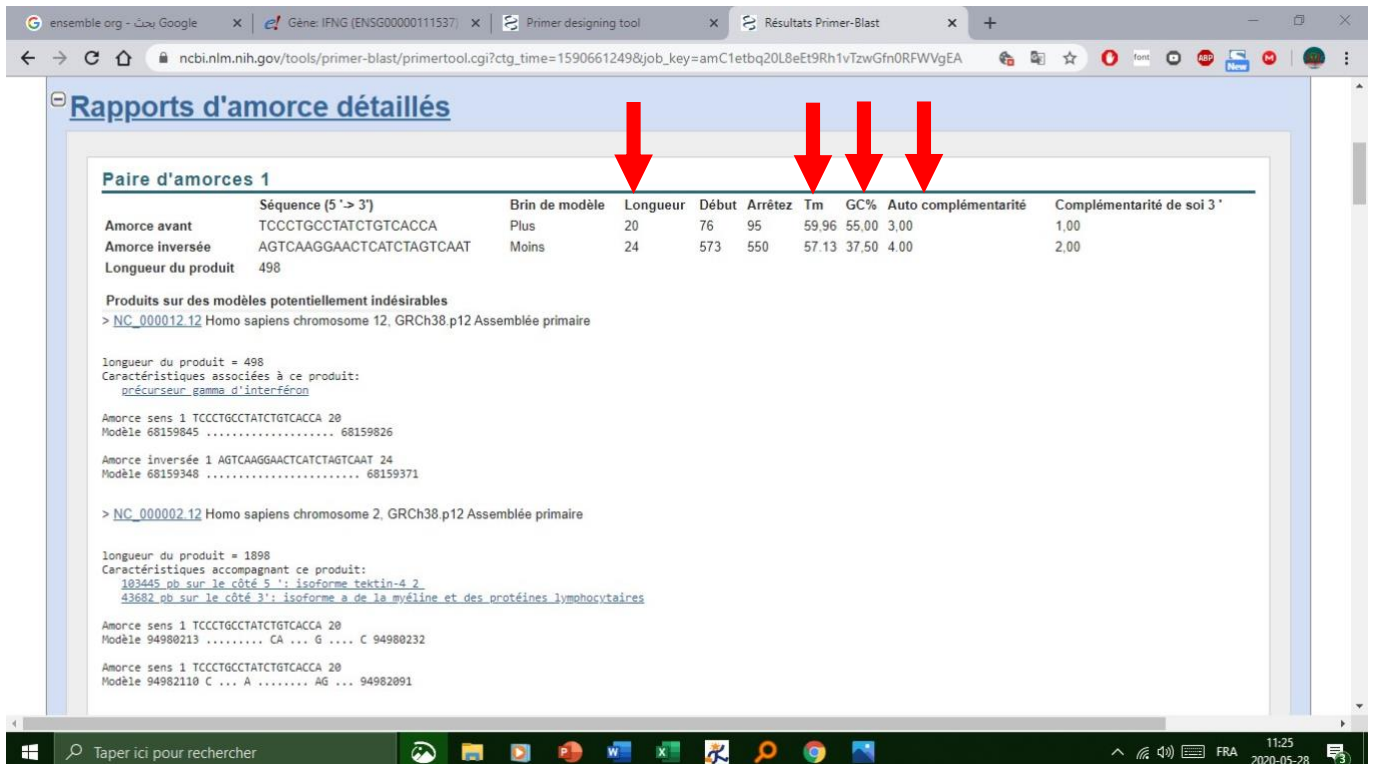


Figure3.3. La paire d'amorces spécifique du gène IFNG

### 3.2 Interprétation des résultats :

Après « Get Primers » nous avons obtenu un rapport détaillés sur les amorces recherchées , soit les amorces sont des produits spécifiques du gène IFNG soit sont des produits aspécifiques étant

donné que les chromosomes peuvent partager des régions nucléotidiques homologues. Donc on est obligé de voir la longueur du produit obtenu avant de voir les caractéristiques de ces amorces.

La longueur du produit est de 498, donc c'est un produit spécifique au gène IFNG étant donné que la longueur de tous les autres produits est supérieure à 1000 Pb.

En outre, ces amorces doivent avoir certaines caractéristiques notamment la longueur de l'amorce elle-même (nombre des nucléotides), la température de fusion, l'autocomplémentarité et la teneur en GC.

Nos résultats sont les suivants : Amorce sens 5' TCCCTGCCTATCTGTCACCA3' et Amorce anti-sens 5' AGTCAAGGAACTCATCTAGTCAAT 3', nous remarquerons que la longueur de la paire d'amorces ne dépasse pas 25 nucléotides et c'est ce que nous recherchons.

La température de fusion est presque similaire 59.96°C pour l'amorce sens et 57.13°C pour l'antisens parce-qu'en règle générale la Tm entre les deux ne dépasse pas 4°C. Aussi on remarque que l'amorce contient un bon pourcentage en GC au niveau de 3' : 55% pour l'amorce sens et 37,5 % pour l'autre.

La directionnalité de ces amorces est vraiment importante c'est pour cela nous verrons l'autocomplémentarité.

L'autocomplémentarité de ces amorces est entre 3 et 4 entre les deux amorces ce qui est suffisant pour éviter la structure d'épingle à cheveux.

Nos résultats possèdent les principales caractéristiques et considérations pour le choix de cette paire d'amorces mais ça reste insuffisant. À partir de ce point, nous avons soumis les séquences d'amorces à un test de confirmation au site USCS un Silico PCR.

Les résultats confirment la spécificité du produit au gène IFNG, parce-que en cas de succès, la recherche renvoie un fichier de séquence au format Fasta contenant toutes les séquences de la base de données qui se trouvent entre eux et incluent la paire d'amorces et la localisation chromosomique qui est 12 comme représenté dans la figure suivante (confirmation des résultats).

### 3.3 Confirmation des résultats

Nous avons soumis les séquences d'amorces obtenues à un test de confirmation au site USCS in Silico-PCR. La recherche renvoie le fichier représenté (Figure 3.3) contenant toutes les séquences de la base de données qui s'y trouvent et inclue la paire d'amorces spécifique du gène IFNG . Le fichier ( Figure 3.3) est mis en majuscule dans les zones où la séquence d'amorces correspond à la séquence de la base et en minuscule ailleurs.

Les résultats de cette confirmation ont donné le produit situé sur le chromosome 12 (Figure 3.3) et le gène IFNG a la même localisation chromosomique et aussi ont donné la longueur du produit qui est de 498 pb.

Donc ces résultats nous confirment la fiabilité et la spécificité des amorces que nous avons conçues.

**UCSC In-Silico PCR**

>chr12:68159348-68159845 498bp TCCCTGCCTATCTGTCACCA AGTCAAGGAACCTCATCTAGTCAAT  
TCCCTGCCTATCTGTCACCAAtctcatcttataaaaaacttgtgaaaaatacgt  
aatcctcaggagacttcaattaggtataaataccaggcagccagaggagt  
gcagcacattggttctgatcatctgaagatcagctattagaagagaaagat  
cagtttaagtcctttggacctgatcagcttgatatacaagaactactgatttc  
aacttctttggcttaattctctcggaaacgatgaaataatacaagttatat  
cttggcttttcagctctgcacatcgttttgggttctcttggctgttactgcc  
aggaccccatatgtaaaaagaagcagaaaaaccttaagaaatattttgtaagt  
atgacttttaatagtagtctgtttgtggttgaaaatgactgaaatcgcac  
ttgctgtagaatcctgataggctgtcatctctgtaggcagtcatttg  
agatttgggtgttattttgttaattATTGACTAGATGAGTTCCTTGACT

**Primer Melting Temperatures**

Forward: 61.6 C tccctgcctatctgtcacca  
Reverse: 55.4 C agtcaaggaactcatctagtcaat  
The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration.  
melting temp comes from [Primer3](#).

**Help**

[What is chr\\_alt & chr\\_fix?](#)  
[Replicating in-Silico PCR results on local machine](#)

Figure3.4. Confirmation du résultat par le site UCSC In-Silico PCR

Le remodelage tissulaire des voies respiratoires (RA) contribue à la symptomatologie de l'asthme, c'est pour cela la recherche future se concentrera sur la RA dans l'asthme et s'intéressera aux médicaments ciblant le remodelage des voies aériennes y compris des anticorps monoclonaux visant des cytokines inflammatoires clés impliquées dans cette maladie telles que IFNG( Grzegorz Kardas *et al.*,2020)

IFNG est une cytokine régulatrice de la nature qualitative de l'activation rapide et puissante des cellules immunitaires, en induisant le phénotype de type 1 pro-inflammatoire (Xiaoyu Hu *et al.* ,2008 ; Anghan Della and coll , 2015 )

Cette cytokine régule à la hausse divers médiateurs pro-inflammatoires en limitant la quantité d'inflammation pour éviter des dommages tissulaires des voies respiratoires (Maha Ali M Al-Mohaya *et al.*,2016)

Ce qui a fait l'hypothèse qu'une déviation immunitaire vers une réponse Th1 puisse protéger contre l'asthme et cela sera confirmé par des études cas-témoins en utilisant différentes techniques telles que la PCR.

La PCR est un test enzymatique très sensible, permettant la détection et la quantification rapide du produit (Lilit Garibyan and coll 2013)

Cependant, une PCR fiable nécessite de bonnes amorces, ce qui signifie généralement une spécificité absolue au produit à détecter (Stephen Bustin *et al.*, 2017).

Nous concevons une bonne paire d'amorces pour le gène IFNG pour arriver à une réalisation cohérente de cette technique plus tard. Nous utilisons des outils Bioinformatiques notamment Primer Blast qui offre la possibilité de concevoir des amorces spécifiques du gène IFNG , bien sur en suivant un flux de travail avec soin. Nous avons obtenu les séquences d'amorces suivantes : Amorce sens : 5' TCCCTGCCTATCTGTCACCA 3' et Amorce anti-sens : 5' AGTCAAGGAACTCATCTAGTCAAT 3' spécifiques du gène IFNG.

Plusieurs études utilisent la conception d'amorces pour le gène IFNG afin de réaliser un test PCR fiable, et étudier l'intervention de cette cytokine ou bien l'association d'IFNG avec différentes maladies inflammatoires notamment l'asthme.

La paire d'amorces suivante : Amorce sens 5' GGCCATCAGCAACAACAACATAAG 3' et Amorce anti-sens 5' GTTGACCTCAAACCTTGGCAATAC 3' est utilisée afin d'évaluer les changements dans les niveaux d'ADNc d'IFNG toujours dans la pathologie d'asthme (Soon-Young Lee *et al.*, 2019).

---

La deuxième paire d'amorces concerne l'étude du polymorphisme +874 A/T du gène IFNG étant donné que ce polymorphisme a été associé à plusieurs maladies inflammatoires : Amorces sens : 5' TCCAAACATGTGCGAGTGT 3' et l'autre : 5' AATATTCAGACATTCACAATTGATTT 3' (Dusan Popadic *et al.*, 2012).

La méthylation de l'ADN dans le promoteur du gène IFNG a été liée au maintien de la fonction immunitaire allergique dans les modèles de cellules humaines, et cela a été confirmé toujours par la réalisation de PCR avec une bonne conception d'amorces suivantes : Amorces sens : Promoteur IFNG 5' TCGGTAAGTACTGACTTGAATGTCCA 3' et l'amorce anti-sens : 5' TCGCTTCCCTGTTTTAGCTGC 3' (Stephanie Lovinsky-Desir and coll, 2014).

Dans l'ensemble, la réalisation du PCR avec la conception des amorces utiles et spécifiques du produit approfondissent notre compréhension de l'intervention de cette cytokine au cours de l'asthme allergique pédiatrique.

L'asthme allergique est un trouble inflammatoire hétérogène caractérisé par une fonction respiratoire en déclin et un remodelage tissulaire qui se traduit par des présentations cliniques différentes, des difficultés respiratoires et des réponses variées aux traitements.

Cette maladie qui cible principalement les poumons humains implique la coordination des composants essentiels du système immunitaire : « cellules et molécules », intervenant dans un processus immunologique très complexe caractérisé par une réponse immunitaire de type Th2. Cela fait l'objet de plusieurs travaux pour savoir ce qui motive le développement de cette voie par rapport aux autres.

Les cytokines Th2 jouent un rôle majeur dans la régulation de la synthèse des IgE, et de l'augmentation et l'activité d'éosinophiles ; elles joueraient donc un rôle crucial dans la conduite d'asthme allergique. C'est pour cela il a été proposé qu'une déviation immunitaire vers une réponse Th1 puisse protéger contre l'asthme puisque les cellules Th1 antagonisent les fonctions des cellules Th2 (Kim *et al.*, 2013).

L'IFN $\gamma$  est comme un puissant inducteur de phénotype de type 1 pro-inflammatoire, l'étude de ce gène est indispensable pour mieux voir s'il existe des associations de ses polymorphismes avec l'apparition de l'asthme et aussi l'intervention complète de cette cytokine dans cette pathologie. Il serait donc nécessaire de réaliser différents tests dans le cadre d'études cas-témoins notamment la PCR.

Cette technique est très sensible et simple permettant l'amplification rapide des fragments d'ADN ; et pour arriver à la réalisation cohérente de cette méthode une bonne paire d'amorces pour le gène IFNG doit être prête.

Des outils Bioinformatiques notamment Primer Blast offrent également la possibilité de concevoir ces amorces avec soin en suivant un flux de travail simple comme détaillé précédemment.

Plusieurs découvertes récentes sur les cellules Th indiquent qu'une autolimitation de l'inflammation, une optimisation du système de mécanismes inhibiteurs locaux, de régulation et de résolution endogènes propre à l'organisme, ainsi qu'une compréhension de la relation entre l'inflammation et le remodelage des voies aériennes crée la possibilité de maximiser la prévention de l'asthme ou du moins minimiser les aspects de la réponse allergique de l'hôte. Des cellules à potentiel régulateur telles que CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, FOXP3<sup>+</sup>, Treg et les cellules T $\gamma\delta$  sont également une cible intéressante pour traiter l'environnement pulmonaire remodelé de façon chronique qui est réfractaire aux traitements anti-inflammatoires (Murdoch and Lloyd, 2010).

Pour terminer, l'inhibition et la suppression de certaines réponses immunitaires et inflammatoires ciblant bien-sûr la bonne intervention sur le bon patient au bon moment, pourrait fournir à l'avenir une thérapie utile pour prévenir et pourquoi pas guérir cette maladie inflammatoire chronique.

**A**

Al-Mohaya, M.A.M., Al-Otaibi, L., Al-Harhi, F., Al Bakr, E., Arfin, M., and Al-Asmari, A. (2016a). Association of genetic polymorphisms in interferon- $\gamma$ , interleukin-6 and transforming growth factor- $\beta$ 1 gene with oral lichen planus susceptibility. *BMC Oral Health* 16, 76.

**B**

Barnig, C., Frossard, N., and Levy, B.D. (2018). Towards targeting resolution pathways of airway inflammation in asthma. *Pharmacol. Ther.* 186, 98–113.

Bhat, M.Y., Solanki, H.S., Advani, J., Khan, A.A., Keshava Prasad, T.S., Gowda, H., Thiyagarajan, S., and Chatterjee, A. (2018). Comprehensive network map of interferon gamma signaling. *J Cell Commun Signal* 12, 745–751.

Borish, L. (2016). The immunology of asthma: Asthma phenotypes and their implications for personalized treatment. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 117, 108–114.

Bustin, S., and Huggett, J. (2017). qPCR primer design revisited. *Biomol Detect Quantif* 14, 19–28.

**C**

Chandrasekar, B.S., Yadav, S., Victor, E.S., Majumdar, S., Deobagkar-Lele, M., Wadhwa, N., Podder, S., Das, M., and Nandi, D. (2015). Interferon-gamma and nitric oxide synthase 2 mediate the aggregation of resident adherent peritoneal exudate cells: implications for the host response to pathogens. *PLoS ONE* 10, e0128301.

Choy, D.F., Hart, K.M., Borthwick, L.A., Shikotra, A., Nagarkar, D.R., Siddiqui, S., Jia, G., Ohri, C.M., Doran, E., Vannella, K.M., et al. (2015). TH2 and TH17 inflammatory pathways are reciprocally regulated in asthma. *Sci Transl Med* 7, 301ra129.

**D**

Dallagi, A., Girouard, J., Hamelin-Morrisette, J., Dadzie, R., Laurent, L., Vaillancourt, C., Lafond, J., Carrier, C., and Reyes-Moreno, C. (2015). The activating effect of IFN- $\gamma$  on monocytes/macrophages is regulated by the LIF-trophoblast-IL-10 axis via Stat1 inhibition and Stat3 activation. *Cell. Mol. Immunol.* 12, 326–341.

Dwivedi, M., Laddha, N.C., Shah, K., Shah, B.J., and Begum, R. (2013). Involvement of interferon-gamma genetic variants and intercellular adhesion molecule-1 in onset and progression of generalized vitiligo. *J. Interferon Cytokine Res.* 33, 646–659.

Diego G Peroni et al. *Front Immunol.* 2020. Microbiome Composition and Its Impact on the Development of Allergic Diseases

**F**

Ferrini, M.E., Hong, S., Stierle, A., Stierle, D., Stella, N., Roberts, K., and Jaffar, Z. (2017). CB2 receptors regulate natural killer cells that limit allergic airway inflammation in a murine model of asthma. *Allergy* 72, 937–947.

Feeney, M., Murphy, K., and Lopilato, J. (2014). Designing PCR primers painlessly. *J Microbiol Biol Educ* 15, 28–29.

Ford, J.G., Rennick, D., Donaldson, D.D., Venkayya, R., McArthur, C., Hansell, E., Kurup, V.P., Warnock, M., and Grünig, G. (2001). IL-13 and IFN-gamma: interactions in lung inflammation. *J. Immunol.* 167, 1769–1777.

## G

Garibyan, L., and Avashia, N. (2013a). Polymerase chain reaction. *J. Invest. Dermatol.* 133, 1–4.

Grzegorz Kardas, Piotr Kuna et Michał Panek (2020). Biological therapies of severe Asthma and their Possible Effets on Air way Remodeling

## H

Hu, X., Chakravarty, S.D., and Ivashkiv, L.B. (2008). Regulation of interferon and Toll-like receptor signaling during macrophage activation by opposing feedforward and feedback inhibition mechanisms. *Immunol. Rev.* 226, 41–56.

## I

Irvin, C., Zafar, I., Good, J., Rollins, D., Christianson, C., Gorska, M.M., Martin, R.J., and Alam, R. (2014). Increased frequency of dual-positive TH2/TH17 cells in bronchoalveolar lavage fluid characterizes a population of patients with severe asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 134, 1175-1186.e7.

Ivashkiv, L.B. (2018). IFN $\gamma$ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 18, 545–558.

## J

Joobeur, S., Mhamed, S.C., Ben Saad, A., Mribah, H., Dekhil, A., Rouatbi, N., and El Kamel, A. (2015). [Allergic asthma in central Tunisia]. *Pan Afr Med J* 20, 133.

## K

Kim, H., Ellis, A.K., Fischer, D., Noseworthy, M., Olivenstein, R., Chapman, K.R., and Lee, J. (2017). Asthma biomarkers in the age of biologics. *Allergy Asthma Clin Immunol* 13, 48.

Kim, Y.-M., Kim, Y.-S., Jeon, S.G., and Kim, Y.-K. (2013). Immunopathogenesis of allergic asthma: more than the th2 hypothesis. *Allergy Asthma Immunol Res* 5, 189–196.

Kumar, R.K., Webb, D.C., Herbert, C., and Foster, P.S. (2006). Interferon-gamma as a possible target in chronic asthma. *Inflamm Allergy Drug Targets* 5, 253–256.

Kuruvilla, M.E., Lee, F.E.-H., and Lee, G.B. (2019). Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 56, 219–233.

Karin Hufnagl et al. *Semin Immunopathol.* 2020 Feb. Dysbiosis of the gut and lung microbiome has a role in asthma

## L

Lambrecht, B.N., and Hammad, H. (2015). The immunology of asthma. *Nat. Immunol.* 16, 45–56.



Lee, S.-Y., Kang, B., Bok, S.-H., Cho, S.S., and Park, D.-H. (2019). Macmoondongtang modulates Th1-/Th2-related cytokines and alleviates asthma in a murine model. *PLoS ONE* 14, e0224517.

Lorenz, T.C. (2012). Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp* e3998.

## M

Mamessier, E., Botturi, K., Vervloet, D., and Magnan, A. (2005). [T regulatory lymphocytes, atopy and asthma: a new concept in three dimensions]. *Rev Mal Respir* 22, 305–311.

Murdoch, J.R., and Lloyd, C.M. (2010). Chronic inflammation and asthma. *Mutat. Res.* 690, 24–39.

Murdoch, J.R., and Lloyd, C.M. (2010). Chronic inflammation and asthma. *Mutat. Res.* 690, 24–39.

## P

Pakkasela, J., Ilmarinen, P., Honkamäki, J., Tuomisto, L.E., Andersén, H., Piirilä, P., Hisinger-Mölkänen, H., Sovijärvi, A., Backman, H., Lundbäck, B., et al. (2020). Age-specific incidence of allergic and non-allergic asthma. *BMC Pulm Med* 20, 9.

Philpott, J., Houghton, K., and Luke, A. (2010). Physical activity recommendations for children with specific chronic health conditions: Juvenile idiopathic arthritis, hemophilia, asthma and cystic fibrosis. *Paediatr Child Health* 15, 213–225.

Popadic, D., Savic, E., Spuran, Z., Markovic, M., Mostarica Stojkovic, M., Ramic, Z., and Pravica, V. (2012). Distinctive frequencies of +874T/A IFN- $\gamma$  gene polymorphism in a healthy Serbian population. *Clin Transl Sci* 5, 461–463.

## S

Savan, R., Ravichandran, S., Collins, J.R., Sakai, M., and Young, H.A. (2009). Structural conservation of interferon gamma among vertebrates. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20, 115–124.

Schett, G., and Neurath, M.F. (2018). Resolution of chronic inflammatory disease: universal and tissue-specific concepts. *Nat Commun* 9, 3261.

Secombes, C.J., and Zou, J. (2017). Evolution of Interferons and Interferon Receptors. *Front Immunol* 8, 209.

Smith, A.J.P., and Humphries, S.E. (2009). Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20, 43–59. 27544215 ; 27544215 ;

Stéphanie Lejeune et al. *Biochem Pharmacol.* 2020 Sep. Childhood asthma heterogeneity at the era of precision medicine: Modulating the immune response or the microbiota for the management of asthma attack

## T

Trivedi, A., Hall, C., Hoffman, E.A., Woods, J.C., Gierada, D.S., and Castro, M. (2017). Using imaging as a biomarker for asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 139, 1–10.

## W

Weronika Barcik et al. *Immunity.* 2020. The Role of Lung and Gut Microbiota in the Pathology of Asthma

Y

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., and Madden, T.L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13, 134.