

UNIVERSITE de TLEMCEN
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

BENZIANI Sarra

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Immunologie

Thème

**Conception des amorces pour le gène *Arg1* exprimé par le macrophage
alternativement activé M2 au cours de l'allergie et le cancer**

Soutenu le 07 Septembre 2020, devant le jury composé de :

Président	ARIBI Mourad	Professeur	Université de Tlemcen
Encadreur	NOUARI Wafa	MCB	Université de Tlemcen
Examineur	MILIANI Marwa	MAB	Université de Tlemcen

Année universitaire 2019/2020

Résumé

Introduction : Les macrophages sont des cellules essentielles du système immunitaire. Ils ont un rôle important au cours de plusieurs pathologies telles que le cancer et l'allergie. Les macrophages impliqués dans la réponse anti tumorale sont des macrophages associés aux tumeurs (TAM) et peuvent participer à la phagocytose des cellules cancéreuses (métastatiques). L'arginase, enzyme exprimé par les macrophages, catalyse la réaction de conversion la L-arginine en L-ornithine et en urée. L'étude de l'expression de cette enzyme au cours des pathologies permet de faciliter la caractérisation de ces cellules.

Objectif : Concevoir des amorces du gène *Arg1* exprimé par le macrophage M2 au cours des réactions allergiques et le cancer.

Matériel et méthodes : La conception de bonnes amorces passe par plusieurs étapes. D'abord, la séquence du gène *Arg1* a été prise à partir du site ENSEMBL. Ensuite, À travers le centre national de l'information biotechnologique (NCBI) et par l'utilisation de l'outil Primer blaste, les amorces spécifiques au gène *Arg1* ont été conçues. Enfin, la paire d'amorces choisie et qui répond aux critères de choix de bonnes amorces a été vérifié par *in silico*-PCR

Résultats : Parmi les 10 paires d'amorces spécifiques du gène Arginase1 obtenues, nous avons choisi la huitième paire d'amorces car elle répond aux critères de bonnes amorces.

Conclusion : Concevoir une bonne amorce aide à réussir la technique PCR, et donc l'amplification correcte du gène *ARG-1* et l'étude de son rôle sur le cancer et les réactions allergiques.

Mots clés : Macrophage, allergie, cancer, Arginase-1, amorces.

Abstract

Introduction: Macrophages are essential cells of the immune system. They play an important role in several pathologies such as cancer and allergy. The macrophages involved in the anti-tumor response are tumor-associated macrophages (TAM), and they can participate in the phagocytosis of (metastatic) cancer cells. Arginase, an enzyme expressed by macrophages, catalyzes the reaction of conversion of L-arginine to L-ornithine and urea. The study of the expression of this enzyme during pathologies makes it possible to facilitate the characterization of these cells.

Objective: To design primers for the *Arg1* gene expressed by the M2 macrophage during allergic reactions and cancer.

Materials and methods: The design of good primers goes through several steps. First, the sequence of the *Arg1* gene was taken from the ENSEMBL site. Then, using the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and Primer blast tool, primers specific to the *Arg1* gene were designed. Finally, the pair of primers chosen and which meets the criteria for choosing good primers was verified by in silico-PCR

Results: Among the 10 pairs of primers specific for the Arginase 1 gene obtained, we chose the eighth pair of primers because it responds to the criteria of good primers.

Conclusion: Designing a good primer helps to achieve the PCR technique, and therefore the correct amplification of the *ARG-1* gene and the study of its effect on cancer and allergic reactions.

Keywords: Macrophage, allergy, cancer, Arginase-1, primers.

ملخص

مقدمة: البلاعم هي خلايا أساسية لجهاز المناعة. لديهم دور مهم في العديد من الأمراض مثل السرطان والحساسية. الضامة المشاركة في الاستجابة المضادة للورم هي الضامة المرتبطة بالورم (TAM) وقد تشارك في البلعمة للخلايا السرطانية (النقيلي). Arginase ، وهو إنزيم تعبر عنه الضامة ، يحفز التفاعل لتحويل L-arginine إلى L-ornithine واليوريا. تتيح دراسة التعبير عن هذا الإنزيم أثناء الأمراض تسهيل توصيف هذه الخلايا.

الهدف: تصميم مواد أولية لجين *Arg1* الذي يعبر عنه البلاعم M2 أثناء تفاعلات الحساسية والسرطان.

المواد والطرق: هناك عدة مراحل في تصميم البادئات الجيدة. أولاً، تم أخذ تسلسل الجين *Arg1* من موقع ENSEMBL. بعد ذلك، من خلال المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI) ومن خلال استخدام أداة Primer blast، تم تصميم بادئات خاصة بجين *Arg1*. أخيراً، تم التحقق من زوج البادئات المختارة والذي يلي معايير اختيار البادئات الجيدة في silico-PCR

النتائج: من بين 10 أزواج من البادئات الخاصة بجين Arginase 1، اخترنا الزوج الثامن من البادئات لأنه يستجيب لخصائص البادئات الجيدة.

الخلاصة: إن وجود برايمر جيد يساعد على تمرير تقنية PCR، وبالتالي التضخيم الصحيح لجين *ARG-1* ودراسة دوره في السرطان وردود الفعل التحسسية.

الكلمات المفتاحية: البلاعم، الحساسية، السرطان، الأرجيناز 1، البادئات.

Avant-propos

Je remercie tout d'abord Allah de m'avoir donné la force et le courage de finir ce travail.

Je me ferais un agréable devoir de remerciement à mon Professeur Mourad ARIBI le directeur de laboratoire BIOMOLIM, Biologie Moléculaire Appliquée et immunologie (Université de Tlemcen) qui m'a accueilli dans son laboratoire.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements envers mon encadrante Dr.Wafaa NAOUARI, qui m'a honoré en acceptant de diriger ce travail. Je lui remercie pour sa disponibilité, sa confiance et ces précieux conseils.

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

Je remercie également toute l'équipe du Laboratoire Biomolim

Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a soutenu tout au long de ma vie et qui m'a arrosé de tendresse et d'amour à ma très chère maman.

A mon support de vie, à celui qui m'a guidé et supporté à mon amour papa

A mon cher frère Mohammed, à mes chères sœurs Maroua et Safaa

A mes chères amis Amina, Loubna, Siham, Batoul, Amel, Oussama, Abd el wadoud et Mohamed.

Table des matières

Résumé	II
Abstract.....	III
Résumé en arabe	IV
Avant-propos.....	V
Table des matières	VII
Liste des figures	IX
Liste des tableaux	X
Liste d'abréviation	XI
Introduction	1
CHAPITRE 1. REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	3
1.1. MACROPHAGE.....	3
1.1.1. Définition	3
1.1.2. Origine	3
1.1.3. Phénotype	4
1.1.3.1. Macrophages M1	5
1.1.3.2. Macrophages M2	6
1.1.4. MACROPHAGE ET PATHOLOGIES	7
1.1.4.1. Macrophages et cancer	7
1.1.4.2. Macrophages et allergie.....	9
1.2. ARGINASE	10
1.2.1. Définition	10
1.2.2. Localisation des gènes	10
1.2.2.1. Isoformes d'arginase.....	11
1.2.2.2. Structure	11
1.2.3. Action de l'arginase	11
1.2.4. Arginase et l'immunité.....	13
1.2.4.1. Arginase et cancer	14
1.2.4.2. Arginase et allergie	14
1.3. PCR	15
1.3.1. Principe de PCR.....	15

1.3.2. Etapes PCR	15
1.3.3. Les acteurs de la PCR	15
1.3.4. Applications de la PCR.....	16
1.4. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS.....	17
1.4.1. Problématique.....	17
1.4.2. But.....	17
1.4.3. Objectif.....	17
CHAPITRE 2. MATERIELS ET METHODES.....	18
2.1. Conception d'amorce	18
2.2. Séquence d'arginase 1	19
2.3. L'outil PRIMER BLAST.....	20
2.4. Confirmation des résultats IN-SILICO PCR	23
CHAPITRE 3. RESULTATS	25
3.1. Résultats de PRIMER BLAST	26
3.2. Confirmation des résultats	26
CHAPITRE 4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	27
CHAPITRE 5. REFERENCES	28

Liste des figures

Figure 1.1.	Chronologie: progrès dans la recherche sur la polarisation des macrophages	4
Figure 1.2.	Polarisation des macrophages en M1 et M2	5
Figure 1.3.	Les fonctions et les produits des macrophages	8
Figure 1.4.	Localisation du gène <i>ARG1</i> sur le chromosome 6 humain	10
Figure 1.5.	Localisation du gène <i>ARG2</i> sur le chromosome 14 humain	10
Figure 1.6.	Structure cristalline de l'arginase 1 humaine	11
Figure 1.7.	Le catabolisme de la L-arginine en L -ornithine/urée ou L-citrulline /NO	12
Figure 1.8.	Métabolisme de la L- arginine par iNOS et l'arginase et les conséquences fonctionnelles dans les cellules	13
Figure 1.9.	Principe de la PCR	16
Figure 2.1.	Base de données « Ensembl »	19
Figure 2.2.	La séquence encadrée du gène <i>Arg1</i> (l'exon 5)	20
Figure 2.3.	La base des données NCBI.	21
Figure 2.4.	L'outil Primer blast	21
Figure 2.5.	Analyse de la séquence d'intérêt par Primer blast	22
Figure 2.6.	Les caractéristiques sélectionnées	23
Figure 2.7.	Le logiciel in- silico PCR	24
Figure 3.1.	Résultat de primer BLAST	25
Figure 3.2.	Confirmation des résultats par le logiciel <i>in Silico</i> -PCR	26

Liste des tableaux

Tableau 1.1.	Différentes propriétés biologiques et physiologiques des sous population des macrophages	7
---------------------	--	---

Liste des abréviations

A**ASL** : argininosuccinate lyase**ARG1** : Arginase 1**ARG2** : Arginase 2**ASS** : argininosuccinate synthase**C****CCL** : C-C Motif Chemokine Ligand**CCR4** : Récepteur de chimiokine C-C type

4

CD : cluster de différenciation**CMH** : complexe majeur d'histocompatibilité**COX2** : cyclooxygénase-2**CXCL** : chemokine (C-X-C motif) ligand**E****EGF** : epidermal growth factor**EMP** : Les progéniteurs érythro-myéloïdes**F****FGF** : facteurs de croissance des fibroblastes**G****GMCS** : facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages**I****IFN- γ** : interferon gamma**IL-**: Interleukine**iNOS** : Nitric oxide synthase inductible**L****LPS** : Leslipopolysaccharide **M****M1** : Macrophages classiques**M2** : Macrophages alternatives**M-CSF** : macrophage colony-stimulating factor**Mcyb** : un maître régulateur transcriptionnel de l'hématopoïèse**MDSC** : cellules suppresseurs dérivé de ligne myéloïde**MRC1** : Mannose Receptor c-type 1**N****NF- κ B** : nuclear factor-kappa B**NO** :Nitric oxide**NOS** :Nitric oxide synthase**Nor-NOHA** :N ω -hydroxy-nor-arginine**NK** : cellules Natural Killer**O****OAT** :ornithine aminotransferase.**ODC** :ornithine decarboxylase;**P****PCR** : polymerase chain reaction**S****STAT** : transducteur de signal et l'activateur de la transcription**T****TAM** : Macrophage Associe au Tumeur**TDF** : facteurs dérivés de tumeur**Tf** : température de fusion**TGF- β** :facteur de croissance transformant beta**TH1** : Cellule T helper 1**TH2** : Cellule T helper 2**TNF- α** : Facteur de nécrose tumoral alpha**TLR** : Les récepteurs de type Toll**V****VEGF** : facteur de croissance d'endothélium vasculaire

Introduction

Les macrophages sont des composants essentiels de l'immunité innée et jouent un rôle central dans les réactions inflammatoires (Gordon & Martinez 2010). Ces cellules interviennent dans la défense de l'hôte contre plusieurs pathologies, notamment le cancer (Biswas & Mantovani 2012). L'environnement cytokinique peut orienter les macrophages, soit vers un profil pro inflammatoire (M1) ou vers un profil anti inflammatoire (M2)(Biswas et al. 2012a).

Le cancer est une pathologie qui se caractérise par une prolifération cellulaire anormale. Les cellules tumorales s'échappent au contrôle du système immunitaire en se fondant dans les tissus environnants. Dans ce sens, il existe une relation dynamique et stable entre les macrophages et les cellules tumorales, qui change en fonction du changement des conditions (Vannini et al. 2015).

Les macrophages associés aux tumeurs (TAM) sont des fournisseurs essentiels d'inflammation liée au cancer (Belgiovine et al. 2016). Ils ont plusieurs fonctions pro-tumorales, comme ils sont une source majeure des cytokines comme l'interleukine-6 (IL-6) et les facteurs de croissance tels que le facteur de croissance épidermique (EGF), qui interviennent dans la prolifération et la survie des cellules cancéreuses (Balkwill 2006; Mantovani et al. 2010). De plus, les macrophages peuvent potentiellement tuer les cellules tumorales s'ils sont correctement stimulés (IFN- γ) (Sica & Mantovani 2012). Ils jouent donc un rôle dans l'échec ou le succès des thérapies anti tumeurs (Belgiovine et al. 2016).

L'allergie se définit comme une réaction d'hypersensibilité causée par des mécanismes immunologiques éprouvés (Tanno et al. 2016). Cette pathologie est induite par les cellules T helper 2 (Th2) et leurs produits et est associée à la polarisation des macrophages vers un profil M2 (Melgert et al. 2011). Les IL-4 et les chimiokines inductibles agissant sur le récepteur de chimiokine C-C type4 (CCR4) (par exemple, CCL22) peuvent favoriser l'asymétrie de la fonction des macrophages (Trujillo et al. 2008).

L'arginase est une métalloenzyme de manganèse binucléaire qui catalyse l'hydrolyse de la L-arginine en L-ornithine et en urée (Durante et al. 2007). Le cycle de l'urée donne une protection contre l'excès d'ammoniac, tandis que la L-ornithine est nécessaire à la formation du collagène, à la prolifération cellulaire et à d'autres fonctions physiologiques (Caldwell et al. 2018a). L'étude de l'expression de cette enzyme au cours du cancer permet de faciliter la caractérisation des macrophages et

Introduction

d'ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques tout en testant de nouvelles molécules anticancéreuses.

Dans cette d'ordre d'idée, ce travail a pour objectif de concevoir des amorces du gène *Arg1* exprimé par le macrophage M2 au cours de réactions allergiques et le cancer.

1 Macrophage

1.1 Définition

Les macrophages ont été identifiés pour la première fois comme des cellules phagocytaires par Elie Metchnikoff. Ce sont des cellules qui ont une capacité destructive des agents pathogènes chez les invertébrés et les vertébrés (Liu et al. 2014). Ces cellules sont les plus plastiques du système hématopoïétique, se résident dans tous les tissus et présentent une grande diversité fonctionnelle (Wynn et al. 2013). Ils ont plusieurs rôles dans l'immunité innée et adaptatives tels que la présentation antigéniques par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et la production des cytokines, telles que les interleukines (IL-6, IL-1) et le facteur de nécrose tumorale (TNF- α)... (Sica et al. 2015).

Les macrophages sont des populations hétérogènes, leurs fonctions et leur phénotype sont régulés par le microenvironnement.

1.2 Origine

Depuis plusieurs années, les chercheurs pensaient que les macrophages proviennent exclusivement de monocytes venant de la moelle osseuse. À nos jours, cette notion a été contestée. Il a été prouvé que la majorité des macrophages résident dans les tissus proviennent des macrophages embryonnaires (Schulz et al. 2012; Sheng et al. 2015; Epelman et al. 2014; Hashimoto et al. 2013; Hoeffel et al. 2015). Les premiers macrophages fournis lors du développement fœtal sont d'origine du sac vitellin (Au niveau des îles sanguines ainsi que les endothéliaux capillaires). Il y aura l'apparition des cellules progénitrices dont leur formation se fait de manière indépendante du maître régulateur transcriptionnel de l'hématopoïèse (Mycb) (Kasaai et al. 2017; Sandberg et al. 2005). De plus, les progéniteurs érythro-myéloïdes (EMP) indépendantes de Mycb prennent un autre chemin plutôt que se joignent la phase monocyttaire intermédiaire. Elles acquièrent directement un noyau transcriptionnel des macrophages, puis elles deviennent des pré macrophages avant qu'elles se différencient en macrophages qui résident les tissus (Mass et al. 2016). La connexion entre le système vasculaire du sac vitellin et le système vasculaire embryonnaire permet la migration de ces macrophages dans tout l'embryon ainsi que sa pénétration dans les tissus comme le foie et le cerveau (Kierdorf et al. 2013). En outre, ces cellules tissulaires ont une capacité d'auto-régénération pour donner de nouvelles cellules capables de participer aux différents processus de défense de l'organisme (Hashimoto et al. 2013).

1.3 Phénotype

Depuis 1905, des recherches sur l'orientation et la classification des sous populations des macrophages, ainsi que les divers facteurs (cellules T helper 1 et 2 (TH1, Th2) et les cytokines et chimiokines) qui interviennent dans ce processus ont été décrites (Figure 1.1).

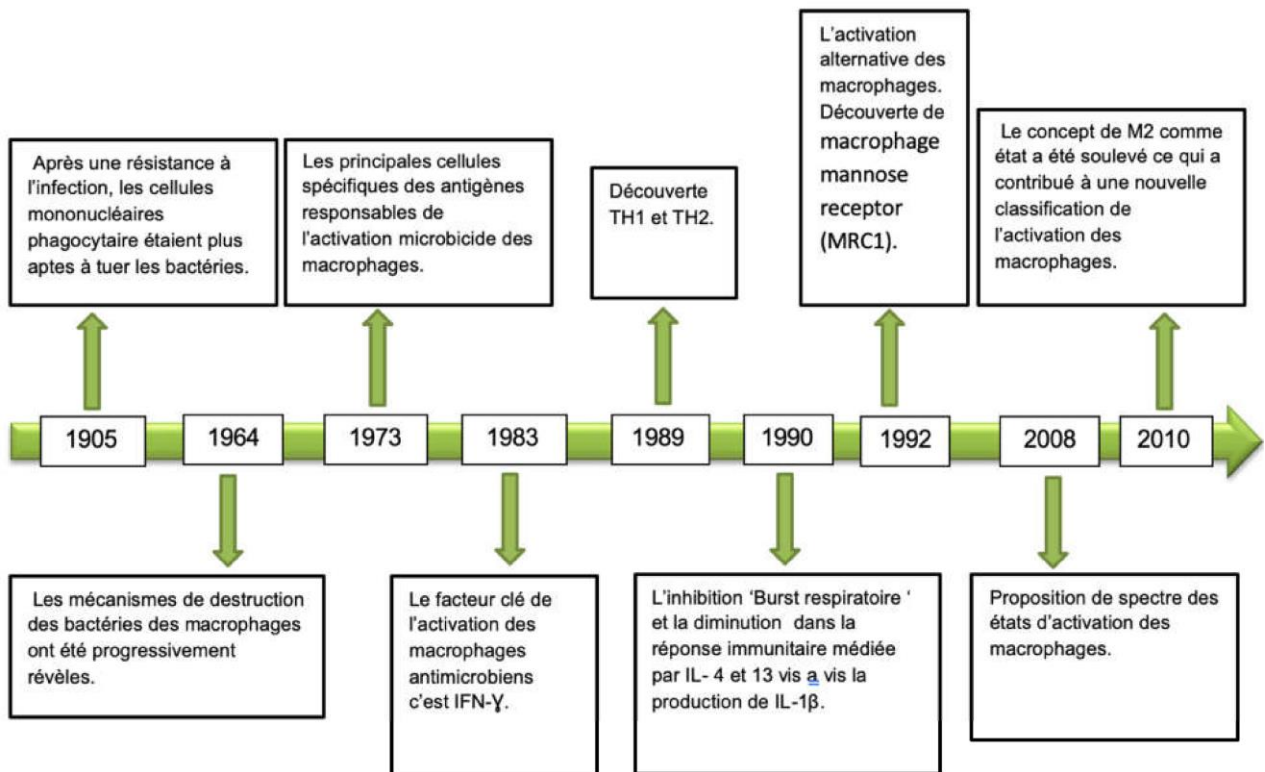


Figure 1.1. Chronologie: progrès dans la recherche sur la polarisation des macrophages (Liu et al. 2014). TH1 : cellule T helper 1, TH2 : cellule T helper 2, MRC1 : Mannose Receptor c-type 1, M2 : macrophages alternatifs IFN- γ : interféron gamma, IL-1 β : interleukine 1 beta, IL-4 : interleukine 4 , IL-13 : interleukine 13 .

La polarisation des macrophages indique comment ces cellules sont activées à un point particulier de l'espace et du temps. Elle n'est pas fixe, parce que les macrophages sont suffisamment plastiques pour incorporer plusieurs signaux comme les tissus endommagés et l'environnement normal des tissus et aussi les microbes. Il existe trois voies importantes pour contrôler la polarisation. Les voies de survie cellulaire et épigénétique, le microenvironnement tissulaire et les facteurs extrinsèques comme les cytokines produites au cours de l'inflammation (Murray 2017). Par conséquent, nombreuses sous populations de macrophages ont été décrites chez la souris et l'homme sur la base de leurs marqueurs membranaires, la production des facteurs spécifiques et les activités biologiques. Il s'agit des macrophages classiquement activés

(pro-inflammatoire) M1 et des macrophages alternativement activés (anti-inflammatoire) M2 (Biswas et al. 2012a; Sica et al. 2015; Locati et al. 2013; Murray 2017)(Figure1.2)

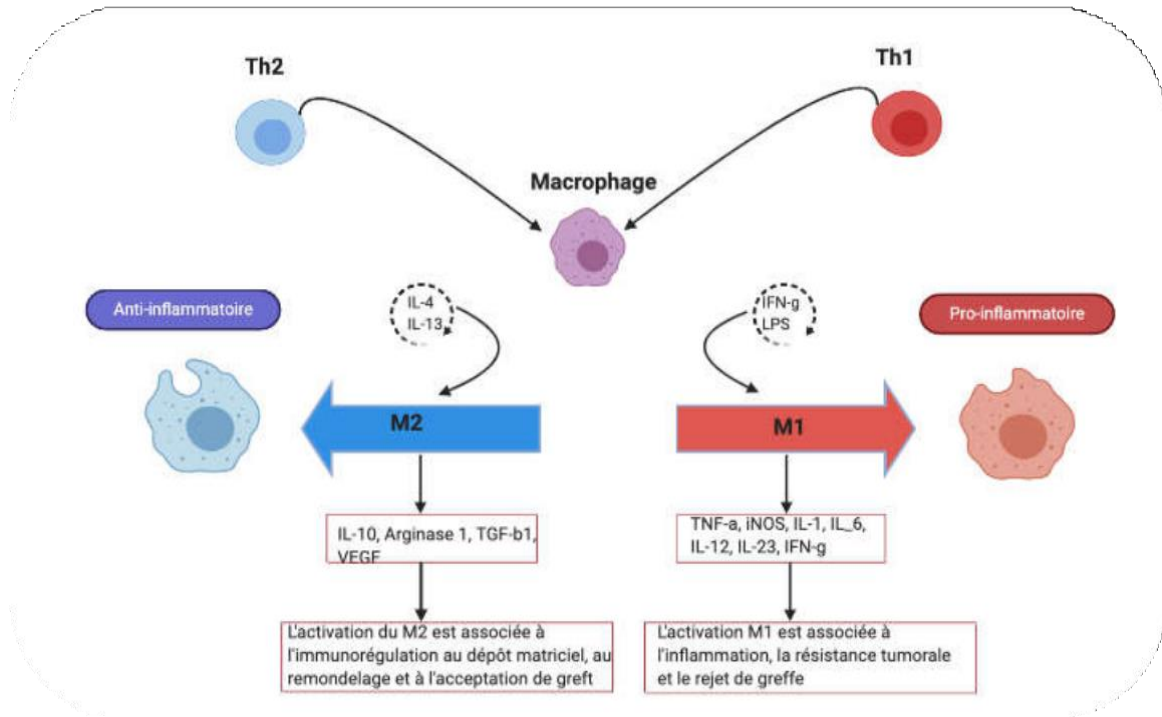


Figure 1.2. Polarisation des macrophages en M1 et M2 (Lee 2019). TH1 : Cellule T helper 1, TH2 : Cellule T helper 2, M1 : Macrophage classiques pro-inflammatoires actives, M2 : Macrophage alternatifs anti-inflammatoires actives, IFN- γ : Interféron gamma, LPS : Les lipopolysaccharide, IL-1 : Interleukine1, IL-4 : Interleukine 4, IL-6 : Interleukine6, IL-10 : Interleukine 10, IL-12 : Interleukine 12, IL-13 : Interleukine 13, IL-23 : Interleukine 23, TNF- α : Facteur de nécrose tumorale alpha, iNOS : Nitric oxide synthase inductible, TGF- β : facteur de croissance transformant beta, VEGF : facteur de croissance de endothélium vasculaire.

1.3.1 Macrophages M1

Les macrophages se polarisent vers un profil pro-inflammatoire M1 impliqué dans la réponse Th1 sous l'effet de différentes cytokines telles que le facteur de la nécrose tumorale (TNF- α), l'interféron-alpha (IFN- α), les lipopolysaccharides (LPS) et des facteurs de croissance comme GM-CSF. Cette sous population produit et sécrète intensément plusieurs molécules comme le TNF- α , des interleukines comme IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12 et IL-23, des chimiokines comme cyclooxygénase-2 (COX-2) et faiblement l'IL-10 (Bashir et al. 2016; Biswas et al. 2012b; Cassetta et al. 2011). Les M1 sont des cellules protectrices contre les bactéries intracellulaires dans le cas des infections aiguës et aussi contre les virus. De plus, ils jouent un rôle crucial dans la neutralisation des agents pathogènes, l'inhibition du développement des cellules cancéreuses et la réparation des lésions tissulaires et la cicatrisation (Tableau1.1) (Lee 2019).

1.3.2 Macrophage M2

Les macrophages M2 sont définis par l'expression des protéines et les gènes de transcription de plusieurs marqueurs exprimés à sa surface, notamment les enzymes, les facteurs de croissance, les hormones, les récepteurs et les cytokines (Röszer 2015). Les macrophages se polarisent vers un profil M2 sous l'effet de différentes molécules secrétées par les cellules Th2 telles que l'IL-4 et l'IL-13 via l'activation de transducteur de signal et l'activateur de la transcription 6 (STAT6). De plus, il existe d'autres cytokines qui permettent la polarisation vers le profil M2 comme l'IL-10 via l'activation de transducteur de signal et l'activateur de la transcription 3 (STAT3) (Porta et al. 2015; Wang et al. 2014). L'IL-33 est l'une des cytokines de la famille de l'IL-1 associée aux Th2 permet la polarisation en M2. Cette polarisation induite par l'IL-33 est caractérisée par une expression élevée de l'arginase 1 (ARG1), C-C Motif Chemokine Ligand 17 (CCL17) et C-C Motif Chemokine Ligand 24 (CCL24) qui participent aux infections respiratoires et aux éosinophilies pulmonaires (Kurowska-Stolarska et al. 2009). Ces cellules se caractérisent par une production accrue de l'IL-10 et du facteur de croissance transformant beta (TGF- β) avec une faible production de l'IL-12. Fonctionnellement, les macrophages M2 jouent un rôle important dans la phagocytose et la récupération des débris et des cellules mortes. De plus, ils possèdent des propriétés pro-fibrotique et pro-angiogénique. Ils participent également dans la réparation tissulaire et la cicatrisation des plaies (Braga et al. 2015; Kurowska-Stolarska et al. 2009).

Sous l'effet de divers stimuli, les M2 peuvent être divisés en quatre sous-groupes, M2a, M2b, M2c, M2d (Tableau 1.1) (Martinez et al. 2013; Chistiakov et al. 2015).

Chapitre 1. Revue de la littérature

Tableau 1.1. Différentes propriétés biologiques et physiologiques des sous populations des macrophages (Shapouri-Moghaddam et al. 2018).

Classes des Macrophages	Cytokines permettent polarisation	qui La	Cytokines, chimiokines et autres médiateurs sécrétés	Rôles
M1	LPS, IFN- γ , TNF α		IL-6, IL-12, IL- 23, IL-27, IL-1 β , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL16, CCL5, iNOS (Souris) Arg-2 (Souris), ROS	Réponse Th1 pro-inflammatoire, activités antimicrobiens et anti-tumorales
M2a	IL-4, IL-13		TGF- β , IL-10, CCL17, CCL18, CCL22, CCL24	Anti-inflammatoire et Remodelage tissulaire
M2b	IL-1 β , ligand TLR, complexe immunitaire		IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , CCL1	Activation Th2 et l'Immunorégulation
M2c	TGF- β , IL-10		TGF- β , IL-10, CCL16, CCL18, CXCL13	Phagocytose des cellules apoptotiques
M2d	Ligand du récepteur de l'adénosine, ligand TLR		IL-10, VEGF	Activité Proangiogénique, progression tumorale

1.4 Macrophage et pathologies

1.4.1 Macrophage et cancer

Le cancer est l'une des causes majeures de mortalité dans le monde. D'après les estimations GLOBOCAN 2018 de l'incidence et de la mortalité du cancer produites par le Centre international de recherches, les scientifiques pensent qu'il y a eu 9,6 millions de décès liés au cancer et 18,1 millions de nouveaux cas en 2018 (Bray et al. 2018). Le cancer est une pathologie qui se caractérise par une transformation et une prolifération excessive de cellules normales de l'organisme. Les cellules tumorales ainsi formées ont la capacité d'échappement aux réponses immunitaires du l'organisme (Nabi & Le 2018).

L'immunité innée médiée par les macrophages constitue la première réponse qui intervient dans la réponse anti-tumorale (Mantovani et al. 2017). Les macrophages M1 sont des cellules capables de produire de grandes quantités de cytokines inflammatoires qui induisent l'inflammation, expriment des niveaux élevés de molécules du CMH et sont impliquées dans la destruction des agents pathogènes et des cellules cancéreuses. De plus, ces cellules stimulent les réponses anti-tumorales par la sécrétion de TNF- α , l'IFN- γ et l'IL-12 (Dhabekar et al. 2011). En revanche, ils suppriment la réponse immunitaire suite à la sécrétion de l'IL-10 ou le TGF- β et

Chapitre 1. Revue de la littérature

stimulent la croissance tumorale et l'angiogenèse par la libération d'IL-23, IL-17, des facteurs de croissance vasculaire endothéliale (VEGF) et des facteurs de croissance des fibroblastes (FGF) (Dhabekar et al. 2011).

Les macrophages intervenants dans la réponse antitumorale sont appelés Macrophages Associe au Tumeur (TAM), dont ils proviennent de la différenciation des monocytes attirés par les facteurs tumoraux. Ces cellules peuvent se différencier en fonction du stade de progression et du type de la tumeur, ainsi que son emplacement dans les tissus tumoraux. Ces sous population sont situées dans divers niveaux du microenvironnement tumoral (Figure 1.3) (Li et al. 2010; Gabrilovich et al. 2012).

Les TAM ont une large gamme de fonction anti-tumorale. Ils peuvent contribuer dans la phagocytose des cellules tumorale (métastatiques), la production de facteurs cytotoxiques et la participation à l'immuno-édition du cancer (O'Sullivan et al. 2012; Qian & Pollard 2010). On outre, ces macrophages ont également plusieurs fonctions pro-tumorales. Ils produisent des facteurs qui participent dans l'angiogenèse, la suppression immunitaire, la croissance tumorale et le remodelage des tissus (Sica & Bronte 2007; Sica et al. 2008).

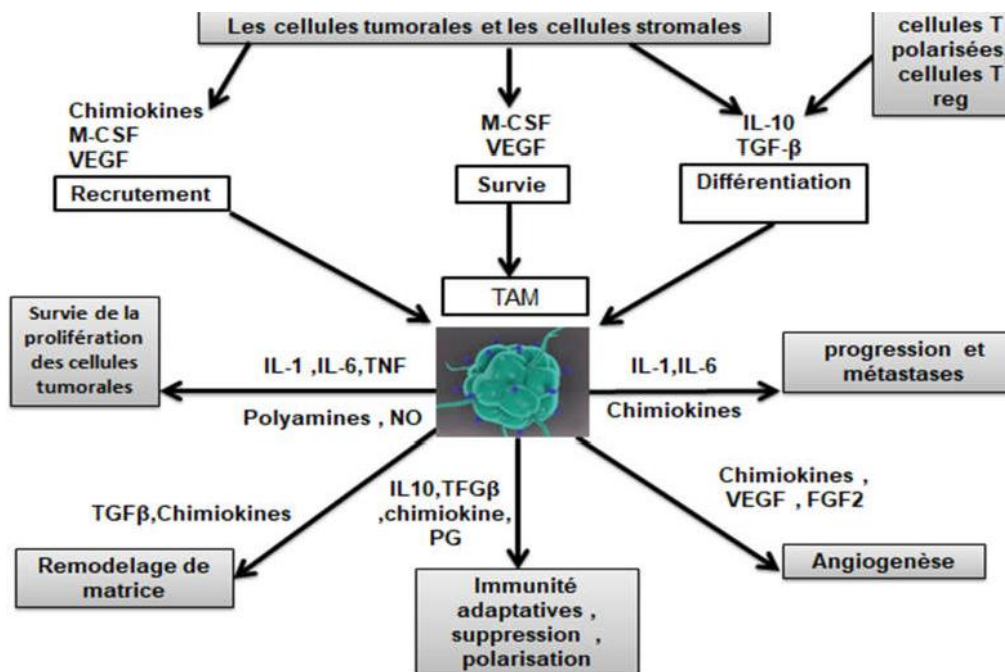


Figure 1.3. Les fonctions et les produits des macrophages (Dhabekar et al. 2011). NO: oxyde nitrique, TGF-β: facteur de croissance transformant beta, M-csf, VEGF : facteur de croissance de endothélium vasculaire, FGF2 : facteur de croissance des fibroblastes, TNF: facteur de nécrose tumoral.

D'une autre part, Les macrophages sous épithéliaux activés peuvent induire des mutations génétiques au niveau des cellules épithéliales voisines, en produisant des espèces réactives d'oxygène et d'azote qui endommagent l'ADN (Meira et al. 2008). Cependant, si la réparation de l'ADN échoue et ces mutations s'accumulent et s'installent, des tumeurs peuvent se développer et conduire à la formation d'une nouvelle vague des facteurs dérivés de tumeur (TDF), y compris macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) et C-C Motif Chemokine Ligand 2(CCL2), ce qui conduit au recrutement des monocytes/macrophages (Richards et al. 2013). Les cellules ainsi recrutées se différencient en sous-populations des macrophages, contrairement à celles de l'environnement inflammatoire aigu, qui soutiennent la reconstruction tissulaire et favorisent la croissance tumorale. Ce changement dans l'état de polarisation des M1 et M2 joue un rôle crucial dans l'activité pro- et anti-tumorale des TAM (Tan et al. 2012). Les macrophages participent donc dans l'échec ou le succès des thérapies anti tumoraux (Belgiovine et al. 2016).

1.4.2 Macrophage et allergie

Selon l'OMS, Les allergies représentent la quatrième cause de maladie au monde, après le cancer, les maladies cardio-vasculaires et le SIDA. Il s'agit d'un dérèglement du système immunitaire contre des substances portant inoffensives pour l'organisme qui sont des allergènes (Tanno et al. 2016). Suite à une exposition aux allergènes, les cellules épithéliales pulmonaires, ainsi que les cellules immunitaires s'activent et libèrent différentes cytokines. Ces cytokines assurent le passage des monocytes sanguins vers les tissus pulmonaires et la polarisation des macrophages vers un profile M2 (Saradna et al. 2018; Nabe et al. 2015). Les cellules M2a sécrètent d'IL-13 et plusieurs chimiokines telles que CCL-17, CCL-18, CCL-22 et CCL-24. Ces cytokines participent à l'activation des cellules Th2 et favorisent l'infiltration d'éosinophiles dans les poumons (Byers & Holtzman 2011; Siddiqui et al. 2013). Cependant, les cellules M2c sont caractérisées par une forte expression d'IL-10 et une faible expression de nuclear factor-kappa B (NF κ B) et de molécules co-stimulatrices (cluster de différenciations CD86, CD40) (Lu et al. 2013).

Enfin, plusieurs études ont prouvé la participation directe des macrophages (M2) dans les réponses allergiques (Girodet et al. 2016). D'autres preuves indiquent que les voies M2 dépendantes de la chitine et de l'arginase jouent un rôle actif dans l'allergie (Reese et al. 2007).

2 Arginase

2.1 Définition

L'arginase est une enzyme qui catalyse l'étape finale du cycle de l'urée afin d'éliminer l'ammoniac toxique en transformant la L- arginine en L -ornithine et urée (Caldwell et al. 2018a). Il existe deux gènes qui codent pour l'arginase : arginase1 (*ARG1*) et arginase2 (*ARG2*). Cette enzyme est sécrétée par les cellules hépatiques, les érythrocytes et les glandes salivaires. L'absence de l'arginase ou son inactivation favorise une accumulation d'arginine (Morris 2012).

2.2 Localisation des gènes

Le gène *ARG1* a un emplacement cytogénétique : 6q23.2 ; cela est le bras long (q) au niveau de séisme chromosome a la position 23.2 (Figure 1.4)(Munder et al. 2005).

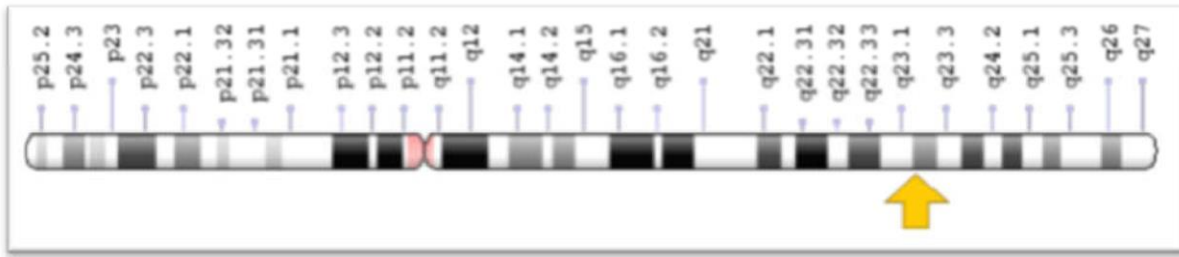


Figure 1.4. Localisation du gène *ARG1* sur le chromosome 6 humain d'après Genetics Home Reference.

Le gène *ARG2* est situé sur le bras long à la position 24.1 de chromosome 14 (14q24.1) (Figure 1.5) (Yang & Ming 2014).

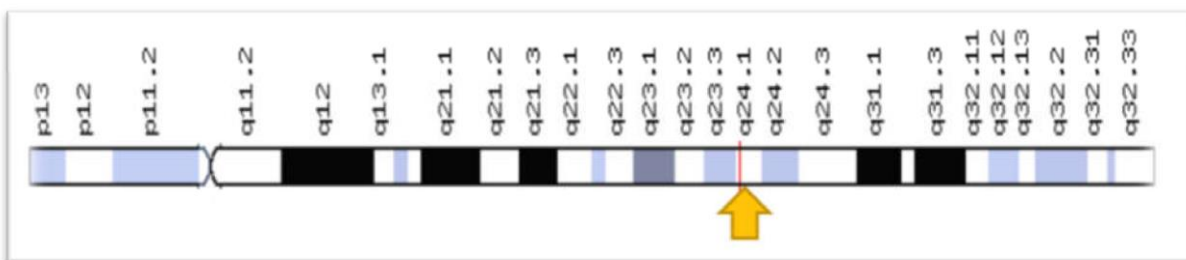


Figure 1.5. Localisation du gène *ARG2* sur le chromosome 14 humain (d'après Genetics Home Reference).

2.2.1 Isoformes d'arginase

La plupart des bactéries, des levures, des plantes et les invertébrés ne contiennent qu'une seule forme d'arginase au niveau mitochondrial. Les invertébrés et des autres animaux possèdent la deuxième isoforme localisée dans le cytosol. L'isoforme ARG-1 (cytologique) se trouve principalement dans le foie, tandis que l'isoforme ARG-2 (mitochondriale) s'exprime dans différent tissus comme l'intestin grêle, la prostate, et les reins (Caldwell et al. 2015). Chez les mammifères, y compris l'homme, les deux isoformes existent, l'une possède 322 acides aminés (ARG1) et l'autre est composée de 354 acides aminés (ARG2). Enfin, ces isoformes ont des fonctions enzymatiques identiques avec 100% d'homologie et partagent plus de 50% de mêmes résidus d'acide aminés (Vlad & Albu 2019).

2.2.2 Structure

Les deux isoformes de l'arginase ont une structure qui contient un site actif et trois sous-unités identiques. Chacune de ces sous-unités a une feuille β parallèle de huit brins entourés de plusieurs hélice α (Figure 1.6)(Caldwell et al. 2018b).

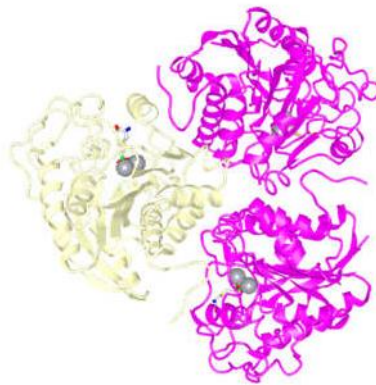


Figure 1.6. Structure cristalline de l'arginase 1 humaine (Di Costanzo et al. 2005).

2.3 Action de l'arginase

L'arginase est l'une des enzymes qui appartiennent à la famille d'uréohydrolases. Au niveau du foie, cette enzyme catalyse la dernière étape du cycle de l'urée. Elle convertit la L-arginine en ornithine et urée. A travers l'activation de l'ornithose carambola-transférase et la carambola phosphate synthase-1, l'arginase convertit l'ornithine et l'ammoniac en L-citruline. Ce dernier peut être recyclé par l'argininosuccinate lyase et l'argininosuccinate synthase en arginine. (Figure 1.7) (Narayanan et al. 2013).

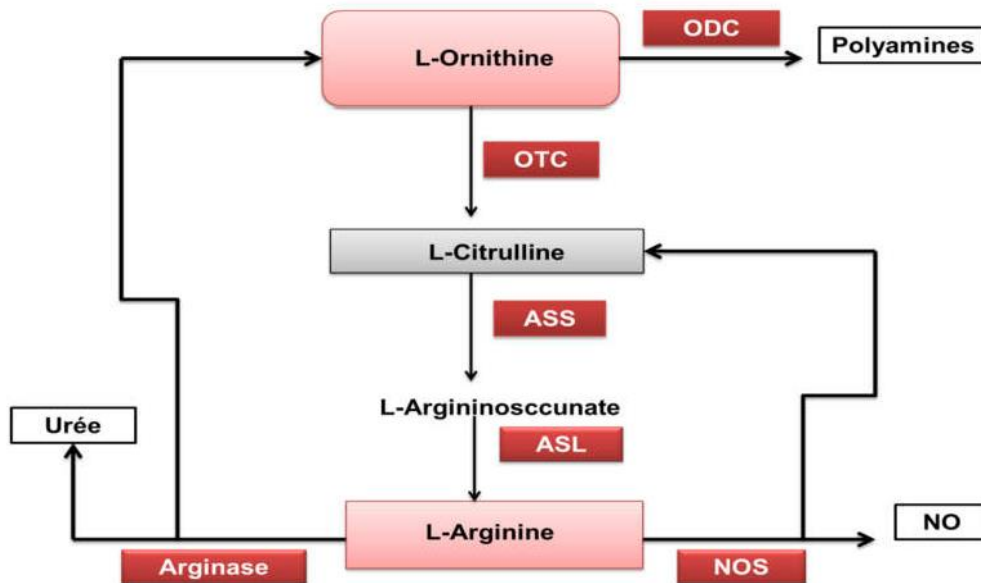


Figure 1.7. Le catabolisme de la L-arginine en L -ornithine/urée ou L-citrulline /NO (Caldwell et al. 2018a). ASL : argininosuccinate lyase, ASS : argininosuccinate synthase, NOS :Nitric oxide synthase, NO :Nitric oxide, ODC : ornithine decarboxylase, OTC : ornithine transcarbamylase

L'arginine est un acide aminé très important dans la réponse immunitaire et impliqué dans différentes voies métaboliques dans plusieurs organes. C'est le substrat de synthèses d'oxyde nitrique (NOS1, NOS2 et NOS3) et aussi de l'arginase (ARG1 et ARG2). C'est deux voies (voie NOS et voie de l'arginase) permettent la formation de monoxyde d'azote (NO) et de proline et de polyamine, respectivement (Tadié et al. 2009; Wijnands et al. 2015). Le NO est un neurotransmetteur, tandis que la polyamine est importante dans la régénération tissulaire, le développement neuronal et la cicatrisation des plaies. De plus, la proline est nécessaire pour la synthèse et l'organisation du collagène en protéine fibreuse (Yang & Ming 2014).

Une hyperactivité de l'arginase peut favoriser la régénération des axones et peut entraîner des problèmes dans les voies respiratoires et un épaissement des vaisseaux sanguins ce qui conduit au développement de plusieurs maladies, telles que l'hypertension, le diabète, le vieillissement et même la croissance des cellules tumorales (Figure 1.8) (Ströhle et al. 2016).

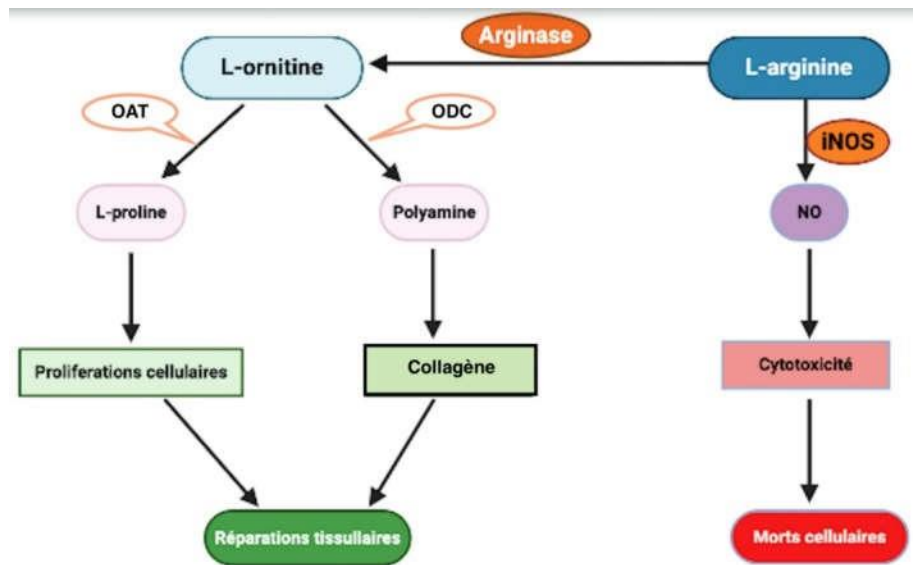


Figure 1.8. Métabolisme de la L- arginine par iNOS et l'arginase et les conséquences fonctionnelles dans les cellules (Yang & Ming 2014). NO :Nitric oxide ,monoxyde d'azote, iNOS :Nitric oxide sythase inductible ODC, ornithine decarboxylase; OAT, ornithine aminotransferase.

2.4 Arginase et l'immunité

Le système immunitaire participe à la protection de l'hôte contre divers agents pathogènes. À travers différents mécanismes, l'hôte utilise des réponses immunitaires innées et adaptatifs pour la neutralisation de ces agents (Chaplin 2010).

L'ARG1 est généralement exprimée par le macrophage. Contrairement à l'expression primaire dans le foie, le gène ARG1 est régulé par différentes molécules stimulatrices externes (IL-4 et 13 secrétés par Th2) (Pauleau et al. 2004). Il est en compétition avec iNOS (codée par Nos2). Ce dernier contrôle la production d'oxyde nitrique dans les macrophages M1. L'expression de Nos2 et Arg1 permet la polarisation des macrophages vers un profil M1 ou M2 (Brightbill 1999; El Kasmi et al. 2008). Il existe une relation entre la réponse TH2 et le grand nombre de macrophage exprimant ARG1 autour et dans les granulomes. Cette isoforme participe dans la régulation de la synthèse de la proline (acide aminé important pour la formation du collagène). Plusieurs études indiquent que l'ARG1 est impliquée de manière élevée dans la fibrose ainsi que dans la régulation de la cicatrisation (Wynn 2004; Loke et al. 2007).

De plus, le rôle spécifique d'Arg1 est encore inconnu. Des études récentes ont commencé à découvrir la fonction de l'arginase dans l'immunité par l'utilisation de la déplétion des

macrophages, l'interférence ARN et un inhibiteur de l'arginase S - (2-éthylbore) - L-cystéine (BEC) (Anthony et al. 2006; Zhao et al. 2008).

2.4.1 Arginase et cancer

La voie d'arginine joue un rôle clé dans le processus de cancer. Des niveaux faibles d'arginine permettent l'inhibition de l'activation et de la prolifération des cellules T cytotoxiques et des cellules Natural Killer (NK). En revanche, des niveaux élevés d'arginine participent dans l'action immunosuppressive des tumeurs (Stanczak et al. 2018).

Des études ont montré que l'épuisement en arginine favorise une activité de l'ARG1 qui participe dans plusieurs effets immunosuppresseurs. L'expression d'ARG1 est élevée dans les cellules suppressives dérivées de la ligne myéloïde (MDSC), ce qui induit une augmentation de nombre de lymphocytes T effecteurs et une réduction remarquable du nombre des cellules tumorales (Miret et al. 2018). Enfin, l'arginase provoque un retard massif de la croissance de la tumeur en induisant les mécanismes d'apoptose (Leung et al. 2019).

2.4.2 Arginase et allergies

L'arginase est une enzyme exprimée également dans les tissus non hépatiques tels que les tissus épithéliaux des voies respiratoires. Comme nous l'avons déjà mentionné, l'arginase a une fonction régulatrice des niveaux de NO qui provient du l'oxyde nitrique synthase constitutive (cNOS) (Maarsingh et al. 2009). Au niveau de l'épithélium des voies respiratoires, l'arginase jouent un rôle clé dans la protection des voies respiratoires. Elle inhibe l'inflammation des voies aériennes en favorisant une bronchodilatation et permettant la sécrétion de nombreux médiateurs par les mastocytes (Meurs et al. 2019).

L'arginase peut être régulée à la hausse en cas d'asthme allergique par différentes cytokines libérées telles que le TGF β , l'IL-4 et l'IL-13, induisant une diminution dans la production du NO dérivée de cNOS et l'augmentation de l'iNOS causée par l'inflammation (Meurs et al. 2019). En outre, l'activité accrue de l'arginase induit une augmentation de la disponibilité de la L-proline et de la polyamine, qui peuvent participer au remodelage des voies respiratoires en stimulant la prolifération des cellules et l'augmentation de la production de fibrose et de collagène (Maarsingh et al. 2009).

3. PCR

3.1 Principe de PCR

La PCR (polymerase chain reaction) est une technique de la biologie moléculaire, basée sur une réaction enzymatique en laboratoire qui permet d'amplifier plusieurs séquences de l'ADN complémentaire ou génomique et de l'ARN (Uhel et al. 2019), d'où l'enzyme ADN polymérase synthétise une séquence complémentaire d'ADN en utilisant deux courts fragments d'ADN appelés amorces. Tous les produits nécessaires à l'amplification sont placés dans une machine de PCR, appelée thermocycleur. Cette technique implique un processus d'amplification exponentielle: une molécule d'ADN est utilisée pour produire deux copies d'un fragment spécifique, puis quatre, puis huit, puis des millions de copies (Figure 1.9) (Clark & Pazdernik 2013)

3.2 Etapes de PCR

Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes. D'abord, La dénaturation commence par chauffer la réaction à environ 95 °C, interrompant les liaisons hydrogène qui maintiennent les deux brins d'ADN matrice ensemble. Puis, la réaction est réduite à environ 50° à 65° C, en fonction des variables physicochimiques des amorces, permettant le recuit de paires de bases complémentaires (Wittwer et al. 1997). Les amorces, qui sont ajoutées à la solution en excès, se lient au début de l'extrémité 3' de chaque brin matrice et empêchent la ré-hybridation du brin matrice avec lui-même. Finalement , la réplication de l'ADN pilotée par les enzymes commence par le réglage de la température de réaction à la valeur qui optimise l'activité de l'ADN polymérase (75° à 80° C)(Figure 1.9) (Ghannam & Varacallo 2020).

3.3 Les acteurs de la PCR

Les éléments majeurs de la PCR sont : une matrice, les bases nucléotidique libres, l'ADN polymérase et les amorces. La matrice d'ADN comprend la zone spécifique que nous désirons amplifier (Ghannam & Varacallo 2020). L'ADN polymérase est une enzyme pour la réplication de l'ADN, Les analogues thermostables de l'ADN polymérase I, comme la Taq polymérase, issue d'une bactérie qui pousse dans les sources chaudes, est utilisée actuellement grâce à sa résistance aux cycles de refroidissement et de chauffage nécessaires à la PCR. Les amorces sont de courts brins d'ADN complémentaires de l'extrémité 3' de chaque région cible (Mullis 1990).

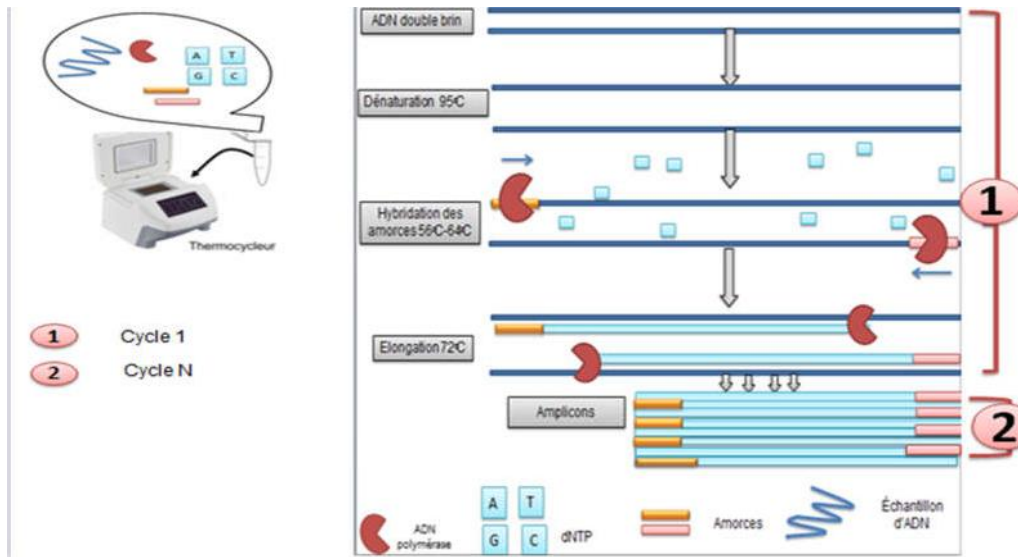


Figure 1.9. Principe de la PCR (Uhel et al. 2019).

3.4 Applications de la PCR

Grâce à sa rapidité et sa simplicité, la PCR a trouvé de manière vite plusieurs applications cliniques, notamment dans les maladies infectieuses (Yang & Rothman 2004). Cette technique peut diagnostiquer les infections virales ou fongiques et les infections bactériennes (*Mycobacterium tuberculosis* dans les prélèvements respiratoires) (Piersimoni et al. 1997). Enfin, la PCR a montré son intérêt pour classer les cancers et prévoir la réponse au traitement (Hoheisel 2006).

4. Problématique

Le macrophage est l'un des principaux composants du système immunitaire. Il joue un rôle important dans la défense contre plusieurs maladies telles que le cancer et les allergies. Le cancer est une maladie des gènes (accumulation de mutations dans l'ADN) et l'allergie est une réaction immunitaire à une substance spécifique généralement inoffensive telle que le pollen. Les macrophages M2 expriment l'arginase, une enzyme qui catalyse l'hydrolyse de l'arginine en L-ornithine et en urée. L'étude de l'expression de cette enzyme au cours du cancer et des allergies permet de faciliter la caractérisation des macrophages et d'ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques tout en testant de nouvelles molécules anticancéreuses.

Objectif : concevoir des amorces pour le gène *Arg1* exprimé par le macrophage M2 au cours du cancer et l'allergie.

But : l'implication du gène *Arg1* exprimé par le macrophage dans l'immunité anti tumorale et au cours de l'allergie.

Chapitre 2. Matériel et méthodes

Chapitre 2. Matériel et méthodes

2.1. Conception des amorces

La conception de bonnes amorces est une étape importante pour la réussite de la PCR. Plusieurs critères doivent être pris en considération au cours de la conception des amorces pour la PCR. Ces critères sont les suivants:

- **La teneur en GC**

Pour qu'une séquence d'amorce soit choisie, des bases poly C et poly G ne doivent pas être présents (BELAID 2017). De plus, le pourcentage optimal en GC dans l'amorce doit être compris entre 40 et 60 (Lorenz 2012).

- **La spécificité**

La spécificité de la séquence dépend au moins partiellement de la longueur de l'apprêt. De toute évidence, il existe de nombreux oligonucléotides uniques à 24 paires de bases qu'à 15 paires de bases (BELAID 2017).

- **La taille de l'amorce**

Lors d'une technique PCR et pour un meilleur résultat, la taille idéale de l'amorce doit être comprise de 15 à 30 bases (Lorenz 2012). De plus, la différence entre les deux amorces sens et anti-sens ne doit pas dépasser 3 nucléotides (Wu et al. 2004).

- **La complémentarité**

Une amorce à brin sens et une amorce à brin anti-sens ne doivent pas être complémentaires l'une de l'autre, et l'extrémité 3' d'une seule amorce ne peut pas être complémentaires à autres séquences de l'amorce parce que ceci peut entraîner la formation des structures de boucles en épingle à cheveux et des dimères d'amorce (Lorenz 2012).

- **Températures de fusion (Tf)**

La température de fusion (Tf) dépend de la longueur des amorces (Rychlik 1995). Elle varie entre 52 et 58 °C. la différence de (Tf) finale entre les deux amorces ne doit pas dépasser 5 °C (Lorenz 2012).

- **La séquence à l'extrémité 3'**

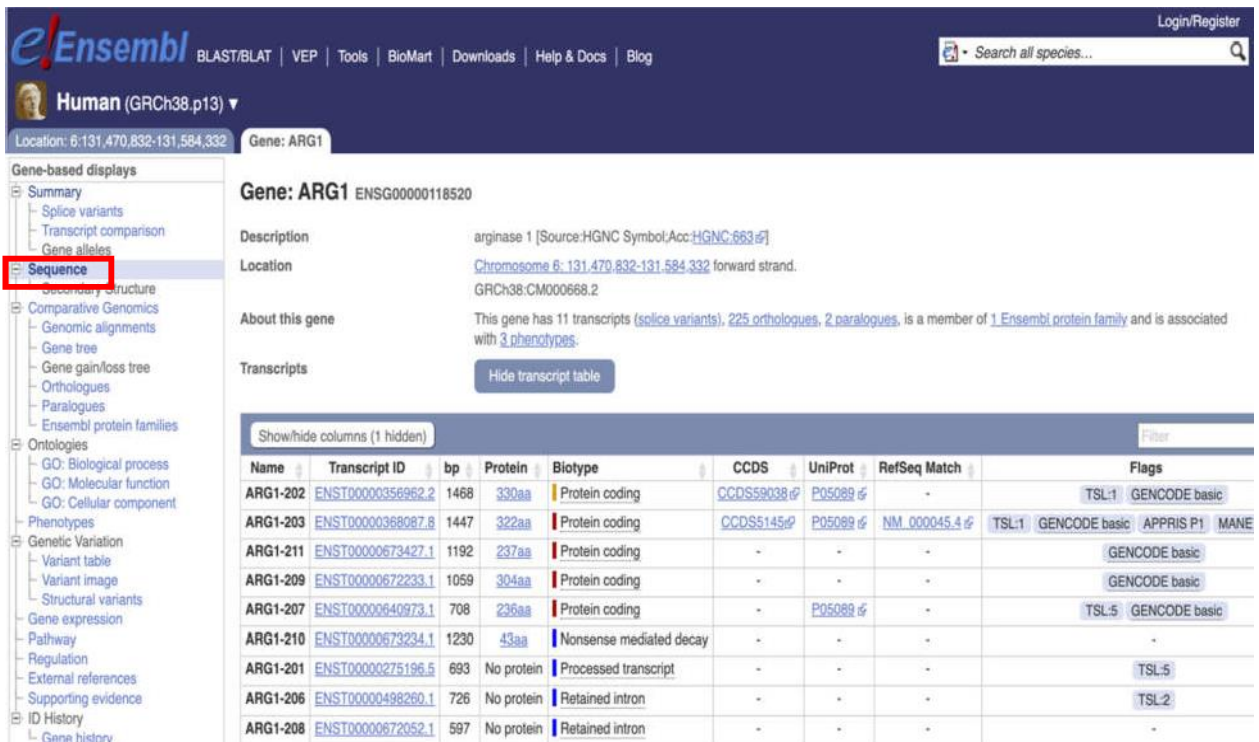
Le positionnement terminal 3' dans les amorces s'est avéré nécessaire pour empêcher une mauvaise préparation (BELAID 2017). La fin des amorces 3' doit contenir une base C ou G

Chapitre 2. Matériel et méthodes

afin de resserrer l'amorce, d'empêcher la complémentarité des extrémités et d'augmenter l'efficacité des amorces(Lorenz 2012).

2.2. Séquence du gène *Arg 1*

La séquence du gène *Arg1* a été prise à partir de la base de données « ENSEMBL » à partir du site « www.ensembl.org » (Fig 2.1 et Fig 2.2). Ce gène contient 12 exons, nous avons choisi l'exon 5.



The screenshot shows the Ensembl genome browser interface for the gene ARG1. The left sidebar has a 'Sequence' option highlighted. The main content area displays the gene description, location, and a table of transcripts. The table has columns for Name, Transcript ID, bp, Protein, Biotype, CCDS, UniProt, RefSeq Match, and Flags.

Name	Transcript ID	bp	Protein	Biotype	CCDS	UniProt	RefSeq Match	Flags
ARG1-202	ENST00000356962.2	1468	330aa	Protein coding	CCDS59038.6	P05089.6	-	TSL:1 GENCODE basic
ARG1-203	ENST00000368087.8	1447	322aa	Protein coding	CCDS5145.6	P05089.6	NM_000045.4.6	TSL:1 GENCODE basic APPRIS P1 MANE
ARG1-211	ENST00000673427.1	1192	237aa	Protein coding	-	-	-	GENCODE basic
ARG1-209	ENST00000672233.1	1059	304aa	Protein coding	-	-	-	GENCODE basic
ARG1-207	ENST00000640973.1	708	236aa	Protein coding	-	P05089.6	-	TSL:5 GENCODE basic
ARG1-210	ENST00000673234.1	1230	43aa	Nonsense mediated decay	-	-	-	-
ARG1-201	ENST00000275196.5	693	No protein	Processed transcript	-	-	-	TSL:5
ARG1-206	ENST00000498260.1	726	No protein	Retained intron	-	-	-	TSL:2
ARG1-208	ENST00000672052.1	597	No protein	Retained intron	-	-	-	-

Figure 2.1. Base de données "Ensembl"

- Après l'obtention de la séquence de gène *ARG-1*, on l'a copiée et l'a collée dans un document Word.

Chapitre 2. Matériel et méthodes

```
TTTTTGATGTTACTGTGTGTATGTAGAGGAAGAGAGAATTTAAGAAATACATTTGTTTA
GTTATGTAATTAATGCCTAGAAAAATTTAATAGTTTGGTGGTAACCTTCAGGCTTCTTAT
AATTTGGATAACCTAAATATTATTGTTTCATGCAACTTTGTGAATAATTCATGTTATGTT
AGGGTTTTAATGTTTCTATGAAACTGTTTCATTCATGGACTAGGTAGAATCCTTTATGTGC
CTCACTTGGAAGGGGAAAAAAGAACAAAAAAGAAAGAAAATCCTACTGCGGGTTGGCA
ACTCTAAAAGGATTTTAATGGATTTATGAAACCCCGAGATTCCTTACAGCCACGAGCTG
TGAATCCACACATGCCAGCAACATTGAATACACTTTTTTTTCTGCCTGGGCACACTTATT
CTAGTAAAGAGAGTGTGATGACAGAACACCTTAGACTTCAACACGCATCTGTGCTTAAAG
AGGATAAAAAACAAAGAACAAAATCAAACAAGACAATGTATGAGTTGAAACTACTAAGGT
TGATTTTCTCCAGGTTTCTCAGGATCTGGGCAGCGTTTTGCTTCTCTTAATTTGGAACC
CTTGCTGTGTACTCTGACTTTTTACTGCAAAACAAATGAGAGAGGCCAGAGGTTAGAGG
CCCAAAGTGCATTTGGACTGTCAGTAAATACTACTTTGCTTCCCCTGAAAATCCTCCAAA
AGTCTCTCCCAAACACAGGGACATTTTGCTGACACAGAAATGTTCTTTTAAAATCCACA
CTGTTCTCACCCACTCTTGAACAGGTTATAATAAATATATAATTTAAAAACCTCACAAAA
GGGAAGCAAGTGTCTCTCTTACCACCCTCCTCCATTAAAACATGGTCATGAGAAATGG
```

Figure 2.2 : La séquence encadrée du gène *Arg1* (exon 5)

2.3. L'outil Primer BLAST

Nous avons utilisé l'outil Primer blaste à partir du centre national de l'information biotechnologique (NCBI) « www.Ncbi.nlm.nih.Gov » pour concevoir les amorces spécifiques au gène *Arg1* (Fig 2.3).

Chapitre 2. Matériel et méthodes

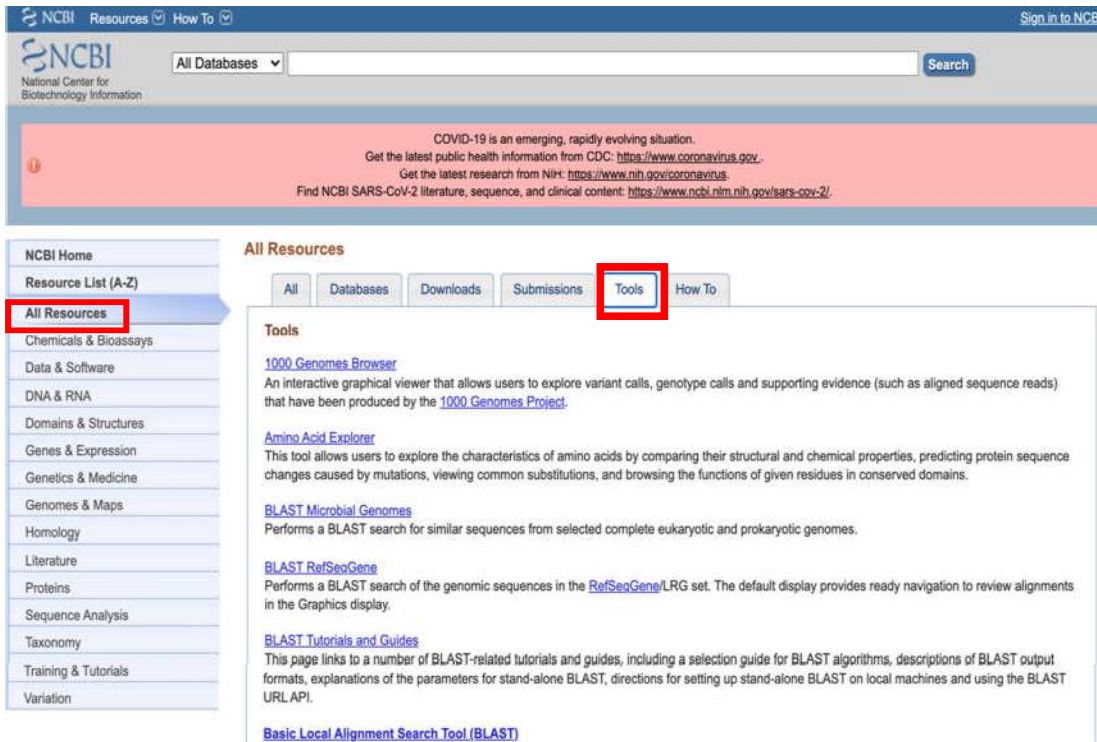


Figure 2.3. La base des données NCBI

Allows users to display, sort, subset and download position-specific score matrices (PSSMs) either from CDD records or from Position Specific Iterated (PSI)-BLAST protein searches. The tool also can align a query protein to the PSSM and highlight positions of high conservation.

[Phenotype-Genotype Integrator \(PheGenI\)](#)
Supports finding human phenotype/genotype relationships with queries by phenotype, chromosome location, gene, and SNP identifiers. Currently includes information from dbGaP, the NHGRI GWAS Catalog, and GTEx. Displays results on the genome, on sequence, or in tables for download.

Primer-BLAST
The Primer-BLAST tool uses Primer3 to design PCR primers to a sequence template. The potential products are then automatically analyzed with a BLAST search against user specified databases, to check the specificity to the target intended.

[ProSplign](#)
A utility for computing alignment of proteins to genomic nucleotide sequence. It is based on a variation of the Needleman Wunsch global alignment algorithm and specifically accounts for introns and splice signals. Due to this algorithm, ProSplign is accurate in determining splice sites and tolerant to sequencing errors.

Figure 2.4 : L'outil Primer BLAST

Afin d'optimiser les résultats, certains paramètres doivent être prises en considération lors de la conception des amorces (Fig 2.5 et 2.6).

Chapitre 2. Matériel et méthodes

- Tout d'abord, nous devons copier la séquence encadrée (exon 5) et la coller dans la case «FAST» et effacer les intervalles non séparables à l'intérieur de notre amorce.

The image shows the Primer-BLAST web interface. At the top, there are logos for NIH (Bibliothèque nationale de médecine des États-Unis) and NCBI (National Center for Biotechnology Information). The main heading is "Primer-BLAST" with the subtitle "Un outil pour trouver des amorces spécifiques". Below this, it says "Recherche d'amorces spécifiques à votre modèle de PCR (en utilisant Primer3 et BLAST)".

The interface is divided into several sections:

- Modèle PCR:** Contains a text area for the DNA sequence. The sequence is: `ACTTTGTGAATAATTCATGTTATGTTAGGGTTTTAAATGTTCTATGAAACTGTTTCATTCTGGACTAGGTAGAATCC
TTTATGCGCTCACTTGGAGGGGAAAAAAGAACAAAAAAGAAAGAAAATCTACTGCGGGTTGGCACTTAAA
AGGATTTAAATGGATTATGAAACCCAGATTTCTTACAGCCACGAGCTGTGAATCCACATGCCAGCAATG
AATACACTTTTTTCTGCGTGGCCACACTTATCTAGTAAAGAGTGTGATGACAGAACCTTAGACTTCAACA
CCCATCTGCTTAAAGAGGATAAAAAACAAGAACAAAATCAAACAAGCAATGTATGAGTTGAACTAAGGT.` To the right, there are input fields for "Amorce avant" (1 to 294) and "Amorce inversée" (625 to ...). The numbers 1, 294, and 625 are highlighted with red boxes.
- Paramètres d'amorce:** Includes fields for "Utiliser mon propre apprêt avant (5' -> 3' sur le brin plus)" and "Utiliser mon propre apprêt inversé (5' -> 3' sur le brin négatif)". It also has "Min" and "Max" fields for primer length (70 and 1000). "Taille du produit PCR" is set to 10. "Nombre d'amorces à retourner" has "Min" (57.0), "Opt" (60.0), "Max" (63.0), and "Max T^m différence" (3).
- Sélection exon / intron:** Includes "Envergure de jonction Exon" (set to "Pas de préférence") and "Match de jonction Exon" (with "Match de min 5'", "Match de min 3'", and "Match de max 3'" fields set to 7, 4, and 8 respectively).

Figure 2.5 : Analyse de la séquence d'intérêt par le Primer blast

Chapitre 2. Matériel et méthodes

- Ensuite, nous avons sélectionné certaines caractéristiques afin d'obtenir nos résultats

Intron length range: Min 1000, Max 1000000

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Specificity check: Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template

Search mode: Automatic

Database: Genomes for selected organisms (primary reference assembly only)

Exclusion: Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix) Exclude uncultured/environmental sample sequences

Organism: Homo sapiens

Entrez query (optional):

Primer specificity stringency: Primer must have at least 2 total mismatches to unintended targets, including at least 2 mismatches within the last 5 bps at the 3' end. Ignore targets that have 6 or more mismatches to the primer.

Max target size: 4000

Allow splice variants: Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input)

Get Primers

Show results in a new window Use new graphic view

Advanced parameters

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

Figure 2.6 : les caractéristiques sélectionnées

2.4. PCR *in-silico*

Une analyse de confirmation de la paire d'amorces choisie a été effectuée par une *in silico*-PCR (PCR virtuelle) qui se fait par un programme dans la plateforme « UCSC genome browser » (genome.ucsc.edu.) (Fig 3.7).

Chapitre 2. Matériel et méthodes



The top part of the image shows the UCSC Genomics Institute logo and navigation menu. The bottom part shows the 'UCSC In-Silico PCR' tool interface with the following fields and options:

UCSC In-Silico PCR

Genome: Assembly: Target: Forward Primer: Reverse Primer:

Max Product Size: Min Perfect Match: Min Good Match: Flip Reverse Primer:

About In-Silico PCR

In-Silico PCR searches a sequence database with a pair of PCR primers, using an indexing strategy for fast performance. See an example [video](#) on our YouTube channel.

Configuration Options

- Genome and Assembly** - The sequence database to search.
- Target** - If available, choose to query transcribed sequences.
- Forward Primer** - Must be at least 15 bases in length.
- Reverse Primer** - On the opposite strand from the forward primer. Minimum length of 15 bases.
- Max Product Size** - Maximum size of amplified region.
- Min Perfect Match** - Number of bases that match exactly on 3' end of primers. Minimum match size is 15.
- Min Good Match** - Number of bases on 3' end of primers where at least 2 out of 3 bases match.
- Flip Reverse Primer** - Invert the sequence order of the reverse primer and complement it.

Figure 3.7 : le logiciel *in-silico* PCR

Chapitre 3. Résultats

Chapitre 3. Résultats

3.1. Résultats de primer blast

Afin de concevoir de bonnes amorces, nous avons d'abord utilisé le site Ensembl pour découvrir l'intégrité du gène *Arg1* qui contient 12 exons. Ensuite, l'exon 5 a été choisi pour obtenir l'amorce spécifique du gène Arginase1 à l'aide de l'outil Primer-Blast. Ceci nous a permis d'obtenir 10 paires d'amorces spécifiques du gène *Arg1*.

La paire d'amorces 8 a été choisie parce qu'elle répond aux critères de bonnes amorces.

- **Température de fusion** : directe 60.75°C et l'inverse 59.53°C
- **Longueur** : directe 22 nucléotides, inverse 20 nucléotides
- **Teneur en GC** : directe 50%, inverse 55%
- **Amorce spécifique** : moins de 1000 paire de base (704)
- **Produits aspécifiques** : tous plus de 1000 paire de base

Les résultats de conception d'amorces par l'outil Primer-blast sont présentés dans (Fig 3.1 et 3.2).

Paire d'amorces 8

Amorce avant	Séquence (5'→3')	Brin de modèle	Longueur	Début	Arrêtez	Tm	GC%	Auto compléментарité	Compléментарité de soi 3'
Amorce avant	AGTTTGGTGGTAACCTTCAGGC	Plus	22	92	113	60,75	50,00	5,00	3,00
Amorce inversée	AGTGGGTGAGAACAGTGTGG	Moins	20	795	776	59,53	55,00	5,00	1,00
Longueur du produit	704								

Produits sur des modèles potentiellement indésirables

> [NC_000008.12](#) Homo sapiens chromosome 6, GRCh38.p12 Assemblée primaire

longueur du produit = 704
Caractéristiques associées à ce produit:
[isoforme arginase-1.1](#)
[isoforme arginase-1.2](#)

Amorce sens 1 AGTTTGGTGGTAACCTTCAGGC 22
Modèle 131573763 131573784

Amorce inversée 1 AGTGGGTGAGAACAGTGTGG 20
Modèle 131574466 131574447

> [NC_000003.12](#) Homo sapiens chromosome 3, GRCh38.p12 Assemblée primaire

longueur du produit = 1866
Caractéristiques accompagnant ce produit:
[1269514 pb sur le côté 5' : protéine P-box-like / WD contenant la répétition TBL1XBI isoforme 1](#)
[471114 pb sur le côté 3' : sous-unité bêta-2 des canaux potassiques activés par le calcium bêta-2](#)

Amorce inversée 1 AGTGGGTGAGAACAGTGTGG 20
Modèle 178336295 T ... T AA 178336276

Amorce inversée 1 AGTGGGTGAGAACAGTGTGG 20
Modèle 178334490 TTG ... G T. 178334509

> [NC_000008.11](#) Homo sapiens chromosome 8, GRCh38.p12 Assemblée primaire

longueur du produit = 1849
Caractéristiques accompagnant ce produit:

Figure 3.1. Résultat à partir d l'outil Primer BLAST

Chapitre 3. Résultats

3.2. Confirmation des résultats

La dernière étape de notre travail est de confirmer les résultats qui se fait par le logiciel «In-Silico PCR » via le site <https://genome.ucsc.edu/> qui nous a donné l'emplacement de notre produit spécifique sur le chromosome 6 et grâce à cela nous avons prouvé la spécificité de ces amorces (Fig 3.2).

The screenshot displays the UCSC In-Silico PCR web interface. At the top, there is a navigation bar with links for Genomes, Genome Browser, Tools, Mirrors, Downloads, My Data, Projects, Help, and About Us. The main form includes fields for Genome (Human), Assembly (Dec. 2013 (GRCh38/hg38)), Target (genome assembly), Forward Primer (AGTTTGGTGGTAACCTTC), Reverse Primer (AGTGGGTGAGAACAGTC), Max Product Size (4000), Min Perfect Match (15), Min Good Match (15), and a Flip Reverse Primer checkbox. Below the form is an 'About In-Silico PCR' section explaining the search process and configuration options. The configuration options include: Genome and Assembly (The sequence database to search), Target (If available, choose to query transcribed sequences), Forward Primer (Must be at least 15 bases in length), Reverse Primer (On the opposite strand from the forward primer. Minimum length of 15 bases), Max Product Size (Maximum size of amplified region), Min Perfect Match (Number of bases that match exactly on 3' end of primers. Minimum match size is 15), Min Good Match (Number of bases on 3' end of primers where at least 2 out of 3 bases match), and Flip Reverse Primer (Invert the sequence order of the reverse primer and complement it). The results section shows a sequence from chromosome 6:131573763-131574466 (704bp) with the forward primer sequence AGTTTGGTGGTAACCTTCAGGC and reverse primer sequence AGTGGGTGAGAACAGTGGG. The primer melting temperatures are listed as Forward: 61.6 C and Reverse: 58.6 C. A note at the bottom states: 'The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration. The code to calculate the melting temp comes from Primer3.'

Figure 3.2 : Confirmation des résultats par le logiciel *in Silico*-PCR

Chapitre 4. Conclusions et perspectives

Chapitre 4. Conclusions et perspectives

Le cancer et les maladies allergiques sont connus dans le monde en raison d'un trouble du système immunitaire. Les cellules tumorales ont une capacité d'échapper aux réponses immunitaires et l'allergie représente un dérèglement du système immunitaire contre les substances qui ne sont pas nocives pour l'organisme mais provoquent des allergies.

Les macrophages sont de grandes cellules qui exercent plusieurs fonctions. Ils sont de deux types, des macrophages classiquement activés (pro-inflammatoires, M1) et des macrophages alternativement activés (anti-inflammatoires, M2). Ces derniers expriment l'arginase, enzyme qui entre en compétition avec iNos exprimée par les M1 pour le même substrat qui est le L-arginine. L'arginase permet son conversion en ornithine et urée, tandis que l'iNos le convertit en NO et citruline. L'étude de l'expression de ces enzymes permet de caractériser les phénotypes des macrophages au cours des pathologies.

Le présent travail a pour but de concevoir des amorces pour le gène *ARG1* afin d'étudier, à l'aide d'une PCR, son expression par le macrophage M2 au cours du cancer et de l'allergie.

La mise en œuvre de la technique PCR à l'aide de ses amorces fournira à l'avenir de nouvelles méthodes pour comprendre, détecter et diagnostiquer les maladies allergiques et le cancer tout en évaluant l'effet de *l'ARG-1* sur les macrophages M2 au cours de ces maladies.

Chapitre 5. Références bibliographiques

Chapitre 5. Références bibliographiques

1. .Anthony RM, Urban JF, Alem F, Hamed HA, Rozo CT, Boucher J-L, Van Rooijen N & Gause WC (2006) Memory TH2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nat. Med.* 12, 955–960.
2. Bashir S, Sharma Y, Elahi A & Khan F (2016) Macrophage polarization: the link between inflammation and related diseases. *Inflamm. Res.* 65, 1–11.
3. BELAID N (2017) *Elaboration d’amorces pour le gène de la Glutathion peroxydas 3 GPx3*. TLEMCEN: UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEN. Available at: <http://dspace.univ-tlemcen.dz/bitstream/112/12000/1/Belaid-nadia.pdf>.
4. Belgiovine C, D’Incalci M, Allavena P & Frapolli R (2016) Tumor-associated macrophages and anti-tumor therapies: complex links. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 2411–2424.
5. Biswas SK, Chittechath M, Shalova IN & Lim J-Y (2012a) Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunol. Res.* 53, 11–24.
6. Biswas SK, Chittechath M, Shalova IN & Lim J-Y (2012b) Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunol. Res.* 53, 11–24.
7. Braga TT, Agudelo JSH & Camara NOS (2015) Macrophages During the Fibrotic Process: M2 as Friend and Foe. *Front. Immunol.* 6. Available at: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2015.00602/abstract> [Accessed April 16, 2020].
8. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA & Jemal A (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* 68, 394–424.
9. Brightbill HD (1999) Host Defense Mechanisms Triggered by Microbial Lipoproteins Through Toll-Like Receptors. *Science* 285, 732–736.
10. Byers DE & Holtzman MJ (2011) Alternatively activated macrophages and airway disease. *Chest* 140, 768–774.
11. Caldwell RB, Toque HA, Narayanan SP & Caldwell RW (2015) Arginase: an old enzyme with new tricks. *Trends Pharmacol. Sci.* 36, 395–405.
12. Caldwell RW, Rodriguez PC, Toque HA, Narayanan SP & Caldwell RB (2018a) Arginase: A Multifaceted Enzyme Important in Health and Disease. *Physiol. Rev.* 98, 641–665.
13. Caldwell RW, Rodriguez PC, Toque HA, Narayanan SP & Caldwell RB (2018b) Arginase: A Multifaceted Enzyme Important in Health and Disease. *Physiol. Rev.* 98, 641–665.
14. Cassetta L, Cassol E & Poli G (2011) Macrophage Polarization in Health and Disease. *Sci. World J.* 11, 2391–2402.
15. Chaplin DD (2010) Overview of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S3–S23.
16. Chistiakov DA, Bobryshev YV, Nikiforov NG, Elizova NV, Sobenin IA & Orekhov AN (2015) Macrophage phenotypic plasticity in atherosclerosis: The associated features and the peculiarities of the expression of inflammatory genes. *Int. J. Cardiol.* 184, 436–445.
17. Clark DP & Pazdernik NJ (2013) *Molecular biology* 2nd ed., Waltham, MA: Academic Press.
18. Dhabekar G, Dandekar R & Kingaonkar A (2011) Role of macrophages in malignancy. *Ann. Maxillofac. Surg.* 1, 150.

Chapitre 5. Références bibliographiques

19. Di Costanzo L, Sabio G, Mora A, Rodriguez PC, Ochoa AC, Centeno F & Christianson DW (2005) Crystal structure of human arginase I at 1.29-Å resolution and exploration of inhibition in the immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 13058–13063.
20. El Kasmī KC, Qualls JE, Pesce JT, Smith AM, Thompson RW, Henao-Tamayo M, Basaraba RJ, König T, Schleicher U, Koo M-S, Kaplan G, Fitzgerald KA, Tuomanen EI, Orme IM, Kanneganti T-D, Bogdan C, Wynn TA & Murray PJ (2008) Toll-like receptor–induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. *Nat. Immunol.* 9, 1399–1406.
21. Epelman S, Lavine KJ & Randolph GJ (2014) Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity* 41, 21–35.
22. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S & Bronte V (2012) Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 253–268.
23. Ghannam MG & Varacallo M (2020) Biochemistry, Polymerase Chain Reaction (PCR). In *StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535453/> [Accessed May 18, 2020].*
24. Girodet P-O, Nguyen D, Mancini JD, Hundal M, Zhou X, Israel E & Cernadas M (2016) Alternative Macrophage Activation Is Increased in Asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 55, 467–475.
25. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, Becker CD, See P, Price J, Lucas D, Greter M, Mortha A, Boyer SW, Forsberg EC, Tanaka M, van Rooijen N, García-Sastre A, Stanley ER, Ginhoux F, Frenette PS & Merad M (2013) Tissue-Resident Macrophages Self-Maintain Locally throughout Adult Life with Minimal Contribution from Circulating Monocytes. *Immunity* 38, 792–804.
26. Hoeffel G, Chen J, Lavin Y, Low D, Almeida FF, See P, Beaudin AE, Lum J, Low I, Forsberg EC, Poidinger M, Zolezzi F, Larbi A, Ng LG, Chan JKY, Greter M, Becher B, Samokhvalov IM, Merad M & Ginhoux F (2015) C-Myb+ Erythro-Myeloid Progenitor-Derived Fetal Monocytes Give Rise to Adult Tissue-Resident Macrophages. *Immunity* 42, 665–678.
27. Hoheisel JD (2006) Microarray technology: beyond transcript profiling and genotype analysis. *Nat. Rev. Genet.* 7, 200–210.
28. Kasaai B, Caolo V, Peacock HM, Lehoux S, Gomez-Perdiguero E, Luttun A & Jones EAV (2017) Erythro-myeloid progenitors can differentiate from endothelial cells and modulate embryonic vascular remodeling. *Sci. Rep.* 7, 43817.
29. Kierdorf K, Erny D, Goldmann T, Sander V, Schulz C, Perdiguero EG, Wieghofer P, Heinrich A, Riemke P, Hölscher C, Müller DN, Luckow B, Brouwer T, Debowski K, Fritz G, Opdenakker G, Diefenbach A, Biber K, Heikenwalder M, Geissmann F, Rosenbauer F & Prinz M (2013) Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat. Neurosci.* 16, 273–280.
30. Kurowska-Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, Murphy G, Corrigan CJ, Ying S, Pitman N, Mirchandani A, Rana B, van Rooijen N, Shepherd M, McSharry C, McInnes IB, Xu D & Liew FY (2009) IL-33 Amplifies the Polarization of Alternatively Activated Macrophages That Contribute to Airway Inflammation. *J. Immunol.* 183, 6469–6477.
31. Lee KY (2019) M1 and M2 polarization of macrophages: a mini-review. *Med. Biol. Sci. Eng.* 2, 1–5.
32. Leung SL, Ho MK, Lam YM, Chow HY, So YH & Leung YC (2019) PEGylated recombinant human arginase as a drug for breast cancer. *Hong Kong Med. J. Xianggang Yi Xue Za Zhi* 25 Suppl 9, 28–31.
33. Li Y, Nie C-J, Hu L, Qin Y, Liu H-B, Zeng T-T, Chen L, Fu L, Deng W, Chen S-P, Jia W-H, Zhang C, Xie D & Guan X-Y (2010) Characterization of a novel mechanism of genomic instability involving the SEI1/SET/NM23H1 pathway in esophageal cancers. *Cancer Res.* 70, 5695–5705.
34. Liu Y-C, Zou X-B, Chai Y-F & Yao Y-M (2014) Macrophage Polarization in Inflammatory Diseases. *Int. J. Biol. Sci.* 10, 520–529.

Chapitre 5. Références bibliographiques

35. Locati M, Mantovani A & Sica A (2013) Macrophage Activation and Polarization as an Adaptive Component of Innate Immunity. In *Advances in Immunology*. Elsevier, pp.163–184. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124170285000065> [Accessed April 12, 2020].
36. Loke P, Gallagher I, Nair MG, Zang X, Brombacher F, Mohrs M, Allison JP & Allen JE (2007) Alternative activation is an innate response to injury that requires CD4+ T cells to be sustained during chronic infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 3926–3936.
37. Lorenz TC (2012) Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *J. Vis. Exp.*, 3998.
38. Lu J, Cao Q, Zheng D, Sun Y, Wang C, Yu X, Wang Y, Lee VWS, Zheng G, Tan TK, Wang X, Alexander SI, Harris DCH & Wang Y (2013) Discrete functions of M 2a and M 2c macrophage subsets determine their relative efficacy in treating chronic kidney disease. *Kidney Int.* 84, 745–755.
39. Maarsingh H, Zaagsma J & Meurs H (2009) Arginase: a key enzyme in the pathophysiology of allergic asthma opening novel therapeutic perspectives: Arginase and allergic asthma. *Br. J. Pharmacol.* 158, 652–664.
40. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L & Allavena P (2017) Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 14, 399–416.
41. Martinez FO, Helming L, Milde R, Varin A, Melgert BN, Draijer C, Thomas B, Fabbri M, Crawshaw A, Ho LP, Ten Hacken NH, Cobos Jiménez V, Kootstra NA, Hamann J, Greaves DR, Locati M, Mantovani A & Gordon S (2013) Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. *Blood* 121, e57-69.
42. Mass E, Ballesteros I, Farlik M, Halbritter F, Gunther P, Crozet L, Jacome-Galarza CE, Handler K, Klughammer J, Kobayashi Y, Gomez-Perdiguero E, Schultze JL, Beyer M, Bock C & Geissmann F (2016) Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis. *Science* 353, aaf4238–aaf4238.
43. Meira LB, Bugni JM, Green SL, Lee C-W, Pang B, Borenshtein D, Rickman BH, Rogers AB, Moroski-Erkul CA, McFaline JL, Schauer DB, Dedon PC, Fox JG & Samson LD (2008) DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *J. Clin. Invest.*, JCI35073.
44. Meurs H, Zaagsma J, Maarsingh H & van Duin M (2019) Recent Patents in Allergy/Immunology: Use of arginase inhibitors in the treatment of asthma and allergic rhinitis. *Allergy* 74, 1206–1208.
45. Miret JJ, Kirschmeier P, Wu M, Huang W, Walker W, Palakurti S, Saccomano N, Hammerman PS, Wong K & Akbay E (2018) Abstract 4065: Suppression of myeloid cell arginase activity leads to therapeutic response in Kras mutant lung cancer by activating anti-tumor immunity. In *Tumor Biology*. Proceedings: AACR Annual Meeting 2018; April 14-18, 2018; Chicago, IL. American Association for Cancer Research, pp.4065–4065. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1538-7445.AM2018-4065> [Accessed March 30, 2020].
46. Morris SM (2012) Arginases and arginine deficiency syndromes: *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 15, 64–70.
47. Mullis KB (1990) The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Sci. Am.* 262, 56–65.
48. Munder M, Mollinedo F, Calafat J, Canchado J, Gil-Lamagnere C, Fuentes JM, Luckner C, Doschko G, Soler G, Eichmann K, Müller F-M, Ho AD, Goerner M & Modolell M (2005) Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. *Blood* 105, 2549–2556.
49. Murray PJ (2017) Macrophage Polarization. *Annu. Rev. Physiol.* 79, 541–566.
50. Nabe T, Wakamori H, Yano C, Nishiguchi A, Yuasa R, Kido H, Tomiyama Y, Tomoda A, Kida H, Takiguchi A, Matsuda M, Ishihara K, Akiba S, Ohya S, Fukui H, Mizutani N & Yoshino S (2015)

Chapitre 5. Références bibliographiques

- Production of interleukin (IL)-33 in the lungs during multiple antigen challenge-induced airway inflammation in mice, and its modulation by a glucocorticoid. *Eur. J. Pharmacol.* 757, 34–41.
51. Nabi K & Le A (2018) The Intratumoral Heterogeneity of Cancer Metabolism. In A. Le, ed. *The Heterogeneity of Cancer Metabolism*. Advances in Experimental Medicine and Biology. Cham: Springer International Publishing, pp.131–145. Available at: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-77736-8_10 [Accessed April 16, 2020].
 52. Narayanan SP, Rojas M, Suwanpradid J, Toque HA, Caldwell RW & Caldwell RB (2013) Arginase in retinopathy. *Prog. Retin. Eye Res.* 36, 260–280.
 53. O’Sullivan T, Saddawi-Konefka R, Vermi W, Koebel CM, Arthur C, White JM, Uppaluri R, Andrews DM, Ngiow SF, Teng MWL, Smyth MJ, Schreiber RD & Bui JD (2012) Cancer immunoediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity. *J. Exp. Med.* 209, 1869–1882.
 54. Pauleau A-L, Rutschman R, Lang R, Pernis A, Watowich SS & Murray PJ (2004) Enhancer-mediated control of macrophage-specific arginase I expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 172, 7565–7573.
 55. Piersimoni C, Callegaro A, Nista D, Bornigia S, De Conti F, Santini G & De Sio G (1997) Comparative evaluation of two commercial amplification assays for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. *J. Clin. Microbiol.* 35, 193–196.
 56. Porta C, Riboldi E, Ippolito A & Sica A (2015) Molecular and epigenetic basis of macrophage polarized activation. *Semin. Immunol.* 27, 237–248.
 57. Qian B-Z & Pollard JW (2010) Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141, 39–51.
 58. Reese TA, Liang H-E, Tager AM, Luster AD, Van Rooijen N, Voehringer D & Locksley RM (2007) Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. *Nature* 447, 92–96.
 59. Richards DM, Hettlinger J & Feuerer M (2013) Monocytes and Macrophages in Cancer: Development and Functions. *Cancer Microenviron.* 6, 179–191.
 60. Rószter T (2015) Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm.* 2015, 1–16.
 61. Rychlik W (1995) Selection of primers for polymerase chain reaction. *Mol. Biotechnol.* 3, 129–134.
 62. Sandberg ML, Sutton SE, Pletcher MT, Wiltshire T, Tarantino LM, Hogenesch JB & Cooke MP (2005) c-Myb and p300 Regulate Hematopoietic Stem Cell Proliferation and Differentiation. *Dev. Cell* 8, 153–166.
 63. Saradna A, Do DC, Kumar S, Fu Q-L & Gao P (2018) Macrophage polarization and allergic asthma. *Transl. Res.* 191, 1–14.
 64. Schulz C, Perdiguero EG, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu B, Jacobsen SEW, Pollard JW, Frampton J, Liu KJ & Geissmann F (2012) A Lineage of Myeloid Cells Independent of Myb and Hematopoietic Stem Cells. *Science* 336, 86–90.
 65. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili S-A, Mardani F, Seifi B, Mohammadi A, Afshari JT & Sahebkar A (2018) Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell. Physiol.* 233, 6425–6440.
 66. Sheng J, Ruedl C & Karjalainen K (2015) Most Tissue-Resident Macrophages Except Microglia Are Derived from Fetal Hematopoietic Stem Cells. *Immunity* 43, 382–393.
 67. Sica A & Bronte V (2007) Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J. Clin. Invest.* 117, 1155–1166.
 68. Sica A, Erreni M, Allavena P & Porta C (2015) Macrophage polarization in pathology. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 4111–4126.

Chapitre 5. Références bibliographiques

69. Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG, Rimoldi M, Biswas SK, Allavena P & Mantovani A (2008) Macrophage polarization in tumour progression. *Semin. Cancer Biol.* 18, 349–355.
70. Siddiqui S, Secor ER & Silbart LK (2013) Broncho-alveolar macrophages express chemokines associated with leukocyte migration in a mouse model of asthma. *Cell. Immunol.* 281, 159–169.
71. Stanczak PS, Grzybowski MM, Wolska P, Zdziarska AM, Mazurkiewicz M, Pilanc P, Gieryng A, Kaminska B, Gzik A, Dziegielewska M, Jedrzejczak K, Borek B, Blaszczyk R, Golebiowski A, Dobrzanski P & Dzwonek K (2018) Abstract B003: Development of OAT-1746, a novel arginase 1 and 2 inhibitor for cancer immunotherapy. In *Immune Modulators. Abstracts: AACR-NCI-EORTC International Conference: Molecular Targets and Cancer Therapeutics; October 26-30, 2017; Philadelphia, PA. American Association for Cancer Research*, pp.B003–B003. Available at: <http://mct.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1535-7163.TARG-17-B003> [Accessed March 30, 2020].
72. Ströhle A, von Bibra H & Hahn A (2016) L-Arginine and vascular health. *Med. Monatsschr. Pharm.* 39, 515–520.
73. Tadié J-M, Guerot E & Delclaux C (2009) Supplémentation en L-arginine en réanimation. *Réanimation* 18, 511–517.
74. Tan KL, Scott DW, Hong F, Kahl BS, Fisher RI, Bartlett NL, Advani RH, Buckstein R, Rimsza LM, Connors JM, Steidl C, Gordon LI, Horning SJ & Gascoyne RD (2012) Tumor-associated macrophages predict inferior outcomes in classic Hodgkin lymphoma: a correlative study from the E2496 Intergroup trial. *Blood* 120, 3280–3287.
75. Tanno LK, Calderon MA, Smith HE, Sanchez-Borges M, Sheikh A, Demoly P & Joint Allergy Academies (2016) Dissemination of definitions and concepts of allergic and hypersensitivity conditions. *World Allergy Organ. J.* 9, 24.
76. Uhel F, Zafrani L & Commission de la recherche translationnelle de la Société de réanimation de langue française (2019) Nouvelles techniques de biologie moléculaire. *Médecine Intensive Réanimation*. Available at: <https://rea.revuesonline.com/10.3166/rea-2019-0119> [Accessed May 14, 2020].
77. Vlad D & Albu S (2019) Arginase Isoform Expression in Chronic Rhinosinusitis. *J. Clin. Med.* 8, 1809.
78. Wang N, Liang H & Zen K (2014) Molecular Mechanisms That Influence the Macrophage M1–M2 Polarization Balance. *Front. Immunol.* 5. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00614/abstract> [Accessed April 13, 2020].
79. Wijnands K, Castermans T, Hommen M, Meesters D & Poeze M (2015) Arginine and Citrulline and the Immune Response in Sepsis. *Nutrients* 7, 1426–1463.
80. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA & Rasmussen RP (1997) Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid Cycle DNA Amplification. *BioTechniques* 22, 130–138.
81. Wu J-S, Lee C, Wu C-C & Shiue Y-L (2004) Primer design using genetic algorithm. *Bioinformatics* 20, 1710–1717.
82. Wynn TA (2004) Fibrotic disease and the TH1/TH2 paradigm. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 583–594.
83. Wynn TA, Chawla A & Pollard JW (2013) Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496, 445–455.
84. Yang S & Rothman RE (2004) PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect. Dis.* 4, 337–348.
85. Yang Z & Ming X-F (2014) Functions of Arginase Isoforms in Macrophage Inflammatory Responses: Impact on Cardiovascular Diseases and Metabolic Disorders. *Front. Immunol.* 5. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00533/abstract> [Accessed March 27, 2020].

Chapitre 5. Références bibliographiques

86. Zhao A, Urban JF, Anthony RM, Sun R, Stiltz J, van Rooijen N, Wynn TA, Gause WC & Shea-Donohue T (2008) Th2 Cytokine-Induced Alterations in Intestinal Smooth Muscle Function Depend on Alternatively Activated Macrophages. *Gastroenterology* 135, 217-225.e1.

Résumé

Introduction : les macrophages sont des cellules essentielles du système immunitaire. Ils ont un rôle important au cours de plusieurs pathologies telles que le cancer et l'allergie. Les macrophages impliqués dans la réponse anti tumorale sont des macrophages associés aux tumeurs (TAM) et peuvent participer à la phagocytose des cellules cancéreuses (métastatiques). L'arginase, enzyme exprimé par les macrophages, catalyse la réaction de conversion la L-arginine en L-ornithine et en urée. L'étude de l'expression de cette enzyme au cours des pathologies permet de faciliter la caractérisation de ces cellules.

Objectif : concevoir des amorces du gène Arg1 exprimé par le macrophage M2 au cours des réactions allergiques et le cancer.

Matériel et méthodes : La conception de bonnes amorces passe par plusieurs étapes. D'abord, la séquence du gène Arg1 a été prise à partir du site ENSEMBL. Ensuite, À travers le centre national de l'information biotechnologique (NCBI) et par l'utilisation de l'outil Primer blaste, les amorces spécifiques au gène Arg1 ont été conçues. Enfin, la paire d'amorces choisie et qui répond aux critères de choix de bonnes amorces a été vérifié par *in silico*-PCR

Résultats : Parmi les 10 paires d'amorces spécifiques du gène Arginase 1 obtenues, nous avons choisi la huitième paire d'amorces car elle répond aux critères de bonnes amorces.

Conclusion : Concevoir une bonne amorce aide à réussir la technique PCR, et donc l'amplification correcte du gène ARG-1 et l'étude de son rôle sur le cancer et les réactions allergiques.

Mots clés : Macrophage, allergie, cancer, Arginase-1, amorces.

Abstract

Introduction: Macrophages are essential cells of the immune system. They play an important role in several pathologies such as cancer and allergy. The macrophages involved in the anti-tumor response are tumor-associated macrophages (TAM), and they can participate in the phagocytosis of (metastatic) cancer cells. Arginase, an enzyme expressed by macrophages, catalyzes the reaction of conversion of L-arginine to L-ornithine and urea. The study of the expression of this enzyme during pathologies makes it possible to facilitate the characterization of these cells.

Objective: to design primers for the Arg1 gene expressed by the M2 macrophage during allergic reactions and cancer.

Materials and methods: The design of good primers goes through several steps. First, the sequence of the Arg1 gene was taken from the ENSEMBL site. Then, using the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and Primer blast tool, primers specific to the Arg1 gene were designed. Finally, the pair of primers chosen and which meets the criteria for choosing good primers was verified by *in silico*-PCR

Results: Among the 10 pairs of primers specific for the Arginase 1 gene obtained, we chose the eighth pair of primers because it responds to the criteria of good primers.

Conclusion: Designing a good primer helps to achieve the PCR technique, and therefore the correct amplification of the ARG-1 gene and the study of its effect on cancer and allergic reactions.

Keywords: Macrophage, allergy, cancer, Arginase-1, primers.

ملخص

مقدمة: البلاعم هي خلايا أساسية لجهاز المناعة. لديهم دور مهم في العديد من الأمراض مثل السرطان والحساسية. الضامة المشاركة في الاستجابة المضادة للورم هي الضامة المرتبطة بالورم (TAM) وقد تشارك في البلعمة للخلايا السرطانية (النقيلي). Arginase ، وهو إنزيم تعبر عنه الضامة ، يحفز التفاعل لتحويل L-arginine إلى L-ornithine واليورينا. تتيح دراسة التعبير عن هذا الإنزيم أثناء الأمراض تسهيل توصيف هذه الخلايا.

الهدف: تصميم مواد أولية لجين Arg1 الذي يعبر عنه البلاعم M2 أثناء تفاعلات الحساسية والسرطان.

المواد والطرق: هناك عدة مراحل في تصميم البادئات الجيدة. أولاً، تم أخذ تسلسل الجين Arg1 من موقع ENSEMBL. بعد ذلك، من خلال المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI) ومن خلال استخدام أداة Primer blast، تم تصميم بادئات خاصة بجين Arg1. أخيراً، تم التحقق من زوج البادئات المختارة والذي يلبي معايير اختيار البادئات الجيدة في *in silico*-PCR

النتائج: من بين 10 أزواج من البادئات الخاصة بجين Arginase 1، اخترنا الزوج الثامن من البادئات لأنه يستجيب لخصائص البادئات الجيدة.

الخلاصة: إن وجود برايمر جيد يساعد على تمرير تقنية PCR، وبالتالي التضخيم الصحيح لجين ARG-1 ودراسة دوره في السرطان وردود الفعل التحسسية.

الكلمات المفتاحية: البلاعم، الحساسية، السرطان، الأرجيناز 1، البادئات.