



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE de TLEMCEM

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

MEMOIRE

Présenté par

TAHI BOCHRA

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Immunologie

Thème

CXCL2 dans l'inflammation, l'auto-immunité, et l'immunité anti-infectieuse

Soutenu le 23 Septembre 2020, devant le jury composé de :

Président	BRAHAMI N	Docteur
Encadreur	BENMANSOUR S A	Docteur
Examineur	Pr SMAHI C M I	Professeur

Année universitaire 2019/2020

Résumé

Introduction

CXCL2 est une petite cytokine appartenant à la famille des chimiokines CXC est caractérisé par la présence d'un motif ELR, ces chimiokines intervient dans l'inflammation, l'auto-immunité et l'immunité anti-infectieuse et agissent sur les cellules immunitaires en induisant leurs recrutement

Objectif

Choisir le bon couple d amorces pour le Primer Blast qui assure l'amplification de la PCR qui fait l'intérêt de notre étude concernant le gène cxcl2, une chimiokine qui est impliqué dans l'inflammation, l'auto immunité et l'immunité anti infectieuse.

Matériels et méthodes

Faire la conception de la bonne amorce par PCR et la confirmer en utilisant les sites de biotechnologie

Résultats

Confirmation de la présence des amorces du gène CXCL2 visées par le PCR et données par le Primer blast.

Conclusions

CXCL2 est une petite chimiokine qui intervient dans les maladies inflammatoire, auto-immunitaire, et dans l'immunité anti-infectieuse,. Le contrôle des niveaux d'expression des récepteurs de chimiokines CXCL2 ou bien le dosage de CXCL2 elle-même dans le sang peut moduler la réaction immunitaire et peut aussi devenir une thérapeutique ciblé pour ces maladies de la santé publique.

Mots clé

CXCL2 , l'inflammation, l'auto-immunité, l'immunité anti-infectieuse.

Abstract

Background:

CXCL2 is a small cytokine belonging to the family of chemokines CXC is characterized by the presence of an ELR motif, these chemokines are involved in inflammation, autoimmunity and anti-infectious immunity and act on immune cells by inducing their recruitment

Objective:

Choose the right pair of primers for the Primer Blast which ensures the amplification of the PCR which is the interest of our study concerning the cxcl2 gene, a chemokine which is involved in inflammation, autoimmunity and anti-infectious immunity.

Materials and methods

Design the correct primer by PCR and confirm it using the biotechnology sites

Results

Confirmation of the presence of the CXCL2 gene primers targeted by the PCR and given by the Primer blast.

Conclusions

CXCL2 is a small chemokine involved in inflammatory, autoimmune, and anti-infective immunity. Monitoring the expression levels of CXCL2 chemokine receptors or the dosage of CXCL2 itself in the blood may modulate the immune response and may also become a targeted therapy for these public health diseases.

Key words

CXCL2, inflammation, autoimmunity, anti-infective immunity

ملخص

المقدمة

CXCL2 عبارة عن سيتوكين صغير ينتمي إلى عائلة chemokines CXCL ، يتميز بوجود عنصر ELR وتشارك هذه الكيمائيات في الالتهابات والمناعة الذاتية والمناعة المضادة للعدوى وتعمل على الخلايا المناعية عن طريق تحريض تجنيدهم

هدف

إختيار الزوج المناسب من البادئات لـ Primer Blast الذي يضمن تضخيم PCR وهو ما بهم دراستنا فيما يتعلق بجين CXCL2 ، وهو مادة كيميائية تشارك في الالتهاب والمناعة الذاتية و للمناعة المضادة للعدوى.

المواد والأساليب

تصميم التمهيدي الصحيح بواسطة PCR والقيام بتأكيده باستخدام مواقع التكنولوجيا الحيوية

النتائج

تأكيداً لوجود البادئات الجينية CXCL2 المستهدفة بواسطة PCR والتي تم تقديمها بواسطة Primer Blast.

الاستنتاجات

CXCL2 عبارة عن مادة كيميائية صغيرة تشارك في المناعة الالتهابية والمناعة الذاتية والمضادة للعدوى قد تؤدي مراقبة مستويات التعبير عن مستقبيلات CXCL2 الكيميائية أو جرة CXCL2 نفسها في الدم إلى تعديل الاستجابة المناعية وقد تصبح أيضاً علاجاً مستهدفاً لهذه الأمراض الصحية العامة

الكلمات الدالة

CXCL2 ، التهاب ، مناعة ذاتية ، مناعة مضادة للعدوى

Avant-propos

Tout ce qui commence terminera un jour, et nous y voilà, nous finissons une étape pour en commencer une autre.

Avant tout, je remercie Dieu pour sa grâce et sa pitié. Je dédie mon succès à mes parents ma mère et mon père que dieu les protège, à mon frère « Kadiro » et ma petite jolie sœur « Arwa ». À tous ma famille et surtout ma tante « Mimi » qui me harcelait avec ses appels, m'a posé des questions sur mes conditions et mes études et m'a exhortée à étudier.

À mes : Simoch, Widos, khadoudj, la princesse dormante et Abdou et à tous mes amis sans exception

À mes entraîneurs « khelif Sidahmed » et « Benchao Lakhder »

Et en fin Je tiens à remercier tous mes professeurs d'immunologie et les membres du jury qui ont accepté de juger ce travail.

Table des matières

Résumé.....	2
Abstract.....	3
Résumé en arabe.....	4
Avant-propos.....	5
Table des matières.....	6.7
Liste des tableaux.....	8
Liste des figures.....	9
Liste des abréviations.....	10
Introduction.....	12
Chapitre1 : Revue de la littérature	
1. le chimiokine CXCL2.....	13
1.1. Les chimiokines	13
1.2. Classification.....	13
1.3. Les CXC chimiokines ou CXC ligands	14
1.3.1. Les CXC chimiokines ELR+	15
1.3.2. Les CXC chimiokines ELR-	15
1.4. Les CC chimiokines ou CC.....	16
1.5. Les C chimiokines ou CL.....	16
1.6. Les CX3C chimiokines ou CX3CL.....	16
1.7. CXCL2.....	17
1.7.1. Historique	17
1.7.2. Le gène de chimiokine MIP-2	17
1.7.3. Production	18
1.7.4. Rôle physiologique et de CXCL2.....	18
1.7.5. Le récepteur de CXCL2.....	19
1.7.6. La signalisation intra cellulaire	21
2. CXCL2 et l'inflammation.....	21

2.1. L'inflammation.....	21
2.2. Cxcl2 dans l'inflammation.....	22
3. CXCL2 et l'auto immunité.....	25
3.1. Généralité sur l'auto immunité et les maladies auto-immunes.....	25
3.2. Rôle de cxcl2 dans l'auto immunité.....	25
4. CXCL2 et l'immunité anti infectieuse.....	28
4.1. Principe général de la réponse immunitaire anti infectieuse	28
4.2. CXCL2 dans l'immunité anti infectieuse	28
4.3. Recrutement des neutrophiles par CXCL2.....	29
5. La PCR (Polymérase chaine réaction).....	31
5.1. Définition	31
5.2. Principe.....	31
5.3. Etapes de PCR.....	31
6. problématique et objectif.....	32
Chapitre2 : Matériel et méthodes	
1. Conception d'amorce.....	33
2. Sélection d'amorce.....	33
2.1. Spécificité.....	33
2.2. Efficacité.....	34
2.3. Longueur.....	34
2.4. Température de fusion.....	34
2.5. Teneur en GC.....	35
2.6. La séquence à l'extrémité 3'	36
2.7. Séquences d'amorce complémentaire.....	36
3. La séquence du gène CXCL2.....	36
3.1. Le design de primer	38
3.2. Les caractéristiques d'une bonne amorce	38
Chapitre3 : résultats	39
3.1. Confirmation des résultats.....	40
Chapitre4 : Conclusion	42
Chapitre 5 : Références bibliographiques	43

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification des chimiokines et de leurs récepteurs spécifiques.....15

Liste des figures

Figure.1.1. Structure tridimensionnelle des chimiokines.....	14
Figure .1.2.les différents types des chimiokines.....	14
Figure.1.3.Le gène de chimiokine CXCL2.....	18
Figure.1.4. structure des récepteurs des chimiokines.....	19
Figure.1.5.complexe chimiokine récepteur.....	20
Figure.1.6. le recrutement et l'adhésion des neutrophiles dans l'inflammation.....	23
Figure.2.1.base de donné ensembl.....	37
Figure.2.2. la séquence du gène cxcl2 même.....	37
Figure.2.3. Analyse de la séquence d'intérêt par Primer blast.....	38
Figure.2.4. Résultats de la conception sur primer blast (partie1).....	39
Figure.2.5. Résultats de la conception sur primer blast (partie2).....	39
Figure.2.6.les caractéristiques de l'amorce obtenue.....	40
Figure.2.7. Insertion des amorces PCR in-Silico sur le site.....	41
Figure.2.8. Confirmation des résultats par le logiciel PCR In Silicon.....	41

Liste d'abréviations

A

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

C

CXCL2 : chimiokine CXC a ligand 2

CXCR1 et CXCR2 : des récepteurs pour les chimiokinés CXC

D

DAMP : damage associated molecular pattern

E

ELR : un motif composé d'acide glutamique-arginine-leucine

ELR+ : un motif composé d'acide glutamique-arginine-leucine est présent

ELR- : un motif composé d'acide glutamique-arginine-leucine est absent

G

GPCR : récepteur couplé a la protéine G

GAG : gluco-amino glycane

L

LTreg : lymphocyte T régulatrice

M

MIP-2 : protéine inflammatoire des macrophages 2

MIP-1 : protéine inflammatoire des macrophages 1

N

NAC :N-acétyl-cystéine

NK : Natural killer

O

OPC : cellules progénitrices des oligodendrocytes

P

PBN :N-tert-Butyl-alpha-phenylnitron

S

SEP : sclérose en plaques

T

TNF- α : facteur de nécrose tumorale

Introduction

CXCL2 est une petite cytokine appartenant à la famille des chimiokines CXC. Il a été isolé pour la première fois chez les macrophages et est également connue sous le nom de protéine inflammatoire des macrophages 2 (MIP-2), et caractérisée par la présence d'un motif ELR (Glutamine-Leucine-Arginine) adjacent aux CXC(1–4).

Ces chimiokines interviennent dans les maladies inflammatoire, auto-immunitaire, ainsi que dans l'immunité anti-infectieuse, ils provoquent l'inflammation qui constitue le point commun de ces maladies et agissent sur les cellules immunitaires en induisant leurs recrutement, et leurs activation, aussi bien en condition physiologique que pathologique(1,3).

MIP-2 est libéré par une variété de cellules telles que les sous formes de macrophages, les monocytes, les cellules épithéliales et les hépatocytes, en réponse à une infection ou à une blessure (4)

Le gène codant pour la molécule CXCL2 est localisé avec un nombre d'autres chimiokines CXC dans une courte région (360 kb) du chromosome humain 4 et pour leur étude en utilisant la biotechnologie et la PCR qui nous permettra de mieux connaître cette molécule, d'où l'objectif de notre étude qui consiste à concevoir les bonnes paires d'amorce afin d'assurer la réussite de la PCR(3,5).

Dans ce travail, nous essayons de comprendre le rôle de cette chimiokine dans le processus inflammatoire notamment dans les maladies auto-immunes et infectieuses et nous réalisons une paire d'amorce PCR pour l'amplification de son gène.

Chapitre1 : revue de la littérature

1. Le chimiokine CXCL2

1.1. Les chimiokines

Les chimiokines sont des petites protéines solubles de faible poids moléculaire entre 8 et 14 kDa. La plupart sont très basiques et partagent les caractéristiques suivantes:

Elles existent de manière réversible en tant que monomères, dimères et certaines en tant que oligomères.

Elles activent les récepteurs appartenant à la classe des récepteurs couplé a la protéine G et se lient aux glycosaminoglycanes sulfatés (GAG)(6).

Elles sont impliquées dans le trafic, d'où leur nom (cytokines chimiotactiques)

Enfin, elles induisent l'activation cellulaire, aussi bien en condition physiologique que pathologique (inflammation, organogenèse, angiogenèse, diffusion métastatique, polarisation de la réponse immune...).

Sur la base des cystéines conservées, les chimiokines sont classées en sous-familles CXC et CC. Les N-acétyl-cystéine (NAC) sont des chimiokines CXC qui sont caractérisées par le motif «ELR» conservé précédant le N-terminal Cystéiné (7).

1.2. Classification

les chimiokines présentent une structure tridimensionnelle hautement conservée (figure 1.1). Sur cette base, une nouvelle classification des chimiokines est née en l'an 2000. Environ 50 chimiokines qui présentent divers propriétés physiologiques et pathologiques ont été découvertes (tableau1.1), et la plupart appartiennent aux familles CC et CXC. Les 50 membres de cette famille, ont été classés en quatre groupes selon l'emplacement de la chaîne polypeptidique cystéine, les CXC (α), les CC (β), les XC (γ) et les CX3C (δ) chimiokines (figure 1.2) (8,9).

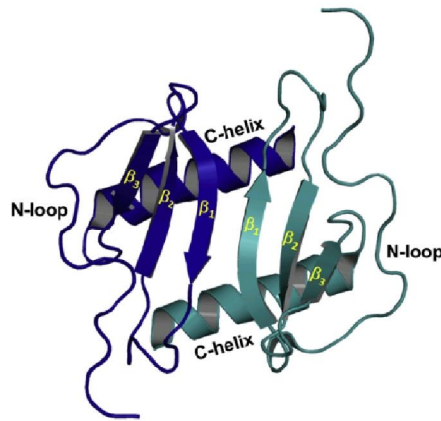


Figure.1.1. Structure tridimensionnelle des chimiokines (Krishna et all, 2019)

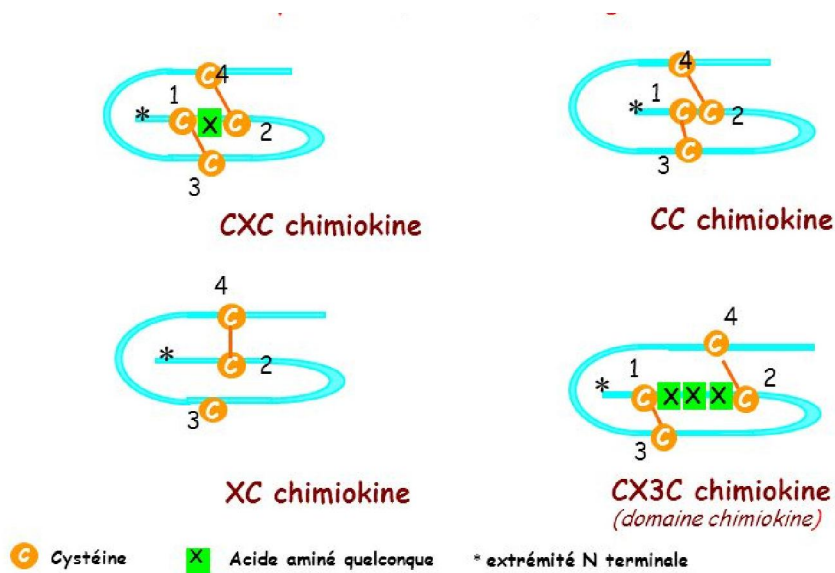


Figure .1.2.les différents types des chimiokines(Beauchap,2016)

1.3. Les CXC chimiokines ou CXC ligands

Ce groupe comporte 16 membres répartis dans deux sous-groupes selon la présence ou non d'un motif ELR (Glutamine-Leucine-Arginine) adjacent aux CXC. La majorité des gènes CXCL se retrouvent dans un cluster sur le chromosome 4, à l'exception de CXCL12, CXCL14 et CXCL16 codés par le chromosome 10(9).

1.3.1. Les CXC chimiokines ELR+

Les chimiokines contenant le motif ELR sont au nombre de 8: CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8 et CXCL15. Ces chimiokines attirent préférentiellement les polynucléaires neutrophiles. Elles sont produites par différentes cellules en réponse à des stimuli cytokiniques pro-inflammatoires (l'IL-1 et le TNF- α). Elles induisent l'adhésion et la migration des neutrophiles aux cellules épithéliales à travers l'endothélium et interagissent avec CXCR1 et CXCR2. Ces chimiokines ont aussi un rôle angiogénique puisqu'elles sont chimioattractantes pour les cellules endothéliales(10).

1.3.2. Les CXC chimiokines ELR-

Ce sous-groupe est composé de 7 membres, CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL12, CXCL13, CXCL14 et CXCL16. Ces chimiokines agissent plutôt sur les Lymphocytes T cytotoxiques et les monocytes avec une faible action sur les neutrophiles, et contrairement aux ELR+, elles ont des propriétés antiangiogéniques et interagissent avec CXCR1(11–13).

CXC chemokines			
CXCL1	GRO α	CXCR2	Neutrophil recruitment
CXCL2	GRO β	CXCR2	Neutrophil recruitment
CXCL3	GRO γ	CXCR2	Neutrophil recruitment
CXCL4	PF4	CXCR3B	Platelet aggregation
CXCL5	ENA-78	CXCR2	Neutrophil recruitment
CXCL6	GCP-2	CXCR1, CXCR2	Neutrophil recruitment
CXCL7	NAP-2	CXCR2	Neutrophil recruitment
CXCL8	IL-8	CXCR1, CXCR2	Neutrophil recruitment
CXCL9	Mig	CXCR3	Effector T cell recruitment
CXCL10	IP-10	CXCR3, CXCR3B	Effector T cell recruitment
CXCL11	I-TAC	CXCR3	Effector T cell recruitment
CXCL12	SDF-1 α/β	CXCR4	Mixed leukocyte recruitment; HIV coreceptor
CXCL13	BCA-1	CXCR5	B cell migration into follicles
CXCL14	BRAK		
CXCL16	–	CXCR6	
C chemokines			
XCL1	Lymphotactin	XCR1	T cell and NK cell recruitment
XCL2	SCM-1 β	XCR1	
CX ₃ C chemokines			
CX ₃ CL1	Fractalkine	CX ₃ CR1	T cell, NK cell, and macrophage recruitment; CTL and NK cell activation

Tableau 1.1. Classification des chimiokines et de leurs récepteurs spécifiques (Abbas et al, 2005)

1.4. Les CC chimiokines ou CC

Ce groupe comporte 28 membres. Le locus de la plupart de ces CC-chimiokines se situe sur le chromosome 17, à l'exception de CCL19 qui se trouve sur le chromosome 9 et des CCL24 et CCL26 qui sont sur le chromosome 7. Les premières cibles de ces chimiokines sont les cellules mononuclées. Ces chimiokines sont impliquées à la fois dans les processus d'homéostasie et d'inflammation. Les CC-chimiokines pro-inflammatoires, impliquées dans l'allergie, sont généralement inductibles : CCL1, CCL2, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL17, CCL22, CCL24 et CCL26, et celles engagées dans l'homéostasie sont exprimées constitutivement, CCL19, CCL20 et CCL21 (14,15). Ces trois chimiokines dirigent les lymphocytes T et les cellules dendritiques vers les sites spécifiques au travers du tissu lymphoïde (16). Les chimiokines CC impliquées dans le développement sont CCL17 et CCL25 (17,18).

1.5. Les C chimiokines ou CL

Cette famille comprend 2 membres, XCL1 et XCL2. XCL1 est capable d'induire la chimiotaxie de Lymphocytes CD4+et CD8+, ainsi que des cellules NK (19). Elle ne présente pas de propriétés chimiotactiques vis-à-vis des monocytes ou des neutrophiles (20). XCL1 peut induire un effet suppressif et cytotoxique contre des tumeurs ou des cellules T effectrices (21). XCL1 et son récepteur XCR1 sont faiblement exprimés dans les LTreg de patients asthmatiques allergiques. Cette sous expression est corrélée avec une diminution de fonction régulatrice des Treg, leur fonction régulatrice peut être rétablie par administration de XCL1 (22).

1.6. Les CX3C chimiokines ou CX3CL

Le seul membre de cette famille est CX3CL1. On connaît deux formes distinctes de cette chimiokine : une forme membranaire et une forme soluble. La forme soluble a une activité chimiotactique vis-à-vis des LTc et des monocytes. La forme membranaire, exprimée sur les cellules endothéliales activées et les cellules épithéliales bronchiques, favorisent l'adhésion de ces leucocytes (23). Plusieurs études ont montré l'implication de cette chimiokine dans l'asthme. Chez les patients allergiques, CX3CL1 est fortement présente dans le sang . De plus, une forte expression membranaire de cette chimiokine est observée au niveau des cellules endothéliales et épithéliales bronchiques (24). Ce qui pourrait contribuer au recrutement rapide des lymphocytes T vers les

voies aériennes. L'absence de récepteur CX3CR1 ou son blocage réduit les paramètres de la réaction allergique pulmonaire (4).

1.7. CXCL2

1.7.1. L'histoire de CXCL2

CXCL2 est une petite cytokine appartenant à la famille des chimiokines CXC. Il a été isolé pour la première fois en 1988 et est également connu sous le nom de protéine inflammatoire des macrophages 2 (MIP-2)(8,25).

Il y a deux familles apparentées de cytokines nommées protéines inflammatoires de macrophages (MIP) 1 et 2 (25). Des données récentes indiquent que MIP-1 et MIP-2 sont membres de deux grandes familles de cytokines dont les ADNc ont été clonés à partir de fibroblastes activés, de cellules T et de macrophages par ADN soustractif techniques d'hybridation. Comparaison des séquences acides aminées de ces deux familles suggèrent qu'elles peuvent avoir surgi au cours de l'évolution d'un précurseur commun et peuvent donc avoir certaines fonctions en commun(8,25,26). MIP 2, comprend les produits plaquettaires tels que le facteur plaquettaire 4 et / 3-thromboglobuline ainsi que plusieurs autres produits géniques qui ont des effets sur un certain nombre de types de cellules, y compris les neutrophiles, les fibroblastes, les cellules hématopoïétiques et les cellules du mélanome(27).

1.7.2. Le gène de chimiokine MIP-2

Le gène CXCL2 est localisé avec un nombre d'autres chimiokines CXC dans une courte région (360 kb) du chromosome humain 4(figure 1.3) et caractérisé par la présence de 2 exons et 3 introns(1,2,5).

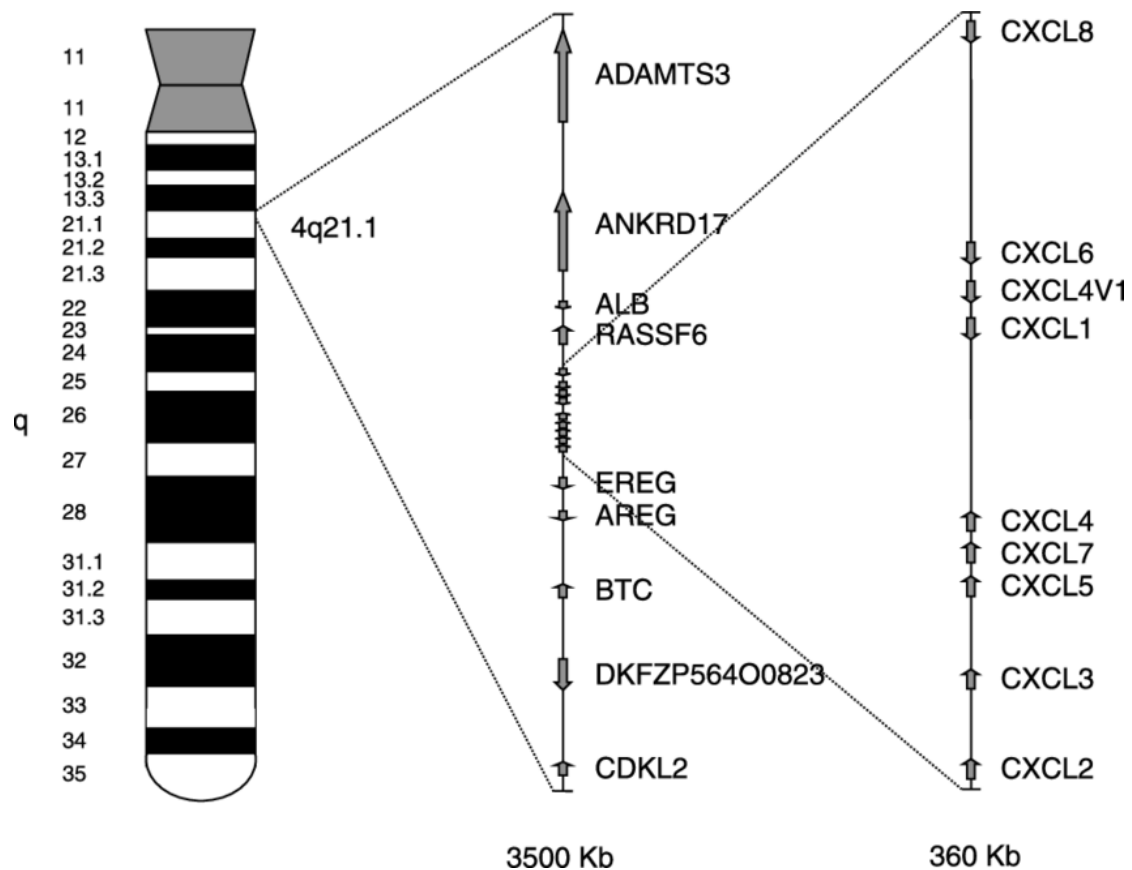


Figure.1.3. Le gène de chimiokine CXCL2 (Ivan Bieche et al.2007).

1.7.3. Production

MIP-2 est libéré par une variété de cellules telles que les sous formes de macrophages, les monocytes, les cellules épithéliales et les hépatocytes, en réponse à une infection ou à une blessure (4) . MIP-2 a été détecté à l'origine dans les macrophages dans le cadre de leur réponse à des stimuli inflammatoires (28) .

La production de MIP-2 est régulée par de multiples facteurs. Comme pour les autres chimiokines, elle est régulée au niveau transcriptionnel par signalisation via les récepteurs Toll like (TLR) 2, TLR3 et TLR4 en réponse à divers agents pathogènes (8,29).

1.7.4. Rôle physiologique de CXCL2

Toutes les chimiokines exercent leurs fonctions en se fixant sur des récepteurs couplés à la protéine G. Certaines chimiokines sont considérées comme pro-inflammatoires. La sécrétion de ces chimiokines est induite lors de la réponse immunitaire afin de favoriser l'arrivée de cellules du système immunitaire au niveau

d'un site infectieux en activant l'intégrine des cellules phagocytaires. D'autres chimiokines sont impliquées dans le contrôle de la migration de cellules au cours des processus de maintenance tissulaire ou au cours du développement(1,30,31).

MIP-2 est un puissant facteur chimiotactique et d'activation des neutrophiles et joue un rôle critique dans le recrutement des neutrophiles lors d'une inflammation aiguë (32) . Les neutrophiles sont les globules blancs le type de cellules sanguines le plus abondant en circulation et un sous-ensemble majeur de cellules immunitaires innées chez les humains. Une activation et un recrutement inappropriés des neutrophiles à la microcirculation contribue aux manifestations pathologiques de nombreux types d'inflammation (33) . MIP-2 affecte le recrutement et l'activation des neutrophiles, en se liant à ses récepteurs spécifiques, CXCR1 et CXCR2 (8).

CXCL2 participe également au maintien de l'homéostasie des neutrophiles et à la régulation de la mobilisation des neutrophiles de la moelle osseuse, au roulement et à l'adhésion étroite aux cellules endothéliales, et au transport vers le circulation sanguine(34) . De plus, l'activation de CXCL2 conduit à la mobilisation rapide des neutrophiles et à l'augmentation significative du nombre de neutrophiles dans le sang. Cependant, les stimuli inflammatoires persistants produisent un excès de CXCL2, et cet excès peut endommager les tissus et entraîner des maladies.

1.7.5. Le récepteur de CXCL2

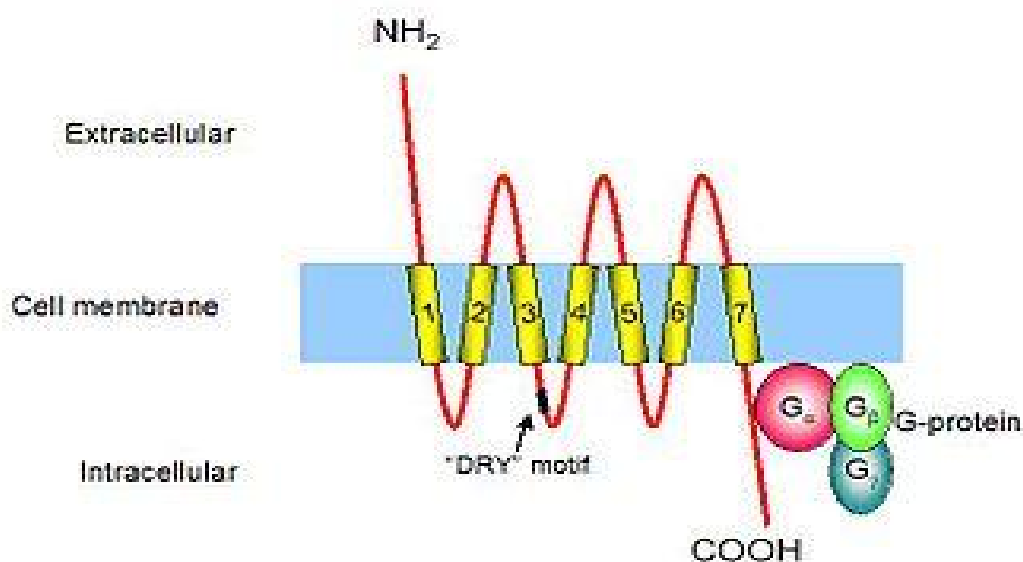


Figure.1.4. structure des récepteurs des chimiokines (Ciar)

Les chimiokines agissent via leurs récepteurs à sept domaines transmembranaires de type GPCR qui présentent tous une structure tertiaire semblable: récepteur transmembranaire à sept hélices alpha et forment une chaîne polypeptidique 350 à 360 acide aminé (figure 1.4) (3).

Les récepteurs des chimiokines sont classés selon la même division que les ligands. Bien qu'il y ait plus que 45 ligands, les récepteurs correspondants sont moins nombreux (moins de vingt). En général, les chimiokines CXC se lient aux récepteurs CXC et les chimiokines CC se lient aux récepteurs CC(3,35). Certains ligands sont hautement sélectifs pour un seul récepteur, tandis que d'autres se lient à plusieurs récepteurs. Les ligands liés aux récepteurs de chimiokines ciblés induisent différents mécanismes, y compris l'adhésion et la migration associées avec des changements de morphologie cellulaire (36,37).

Les neutrophiles humains co-expriment CXCR1 et CXCR2 à des niveaux similaires, qui interagissent avec les chimiokines via deux sites, mais les profils d'activité entre les récepteurs peuvent varier pour une chimiokine donnée et entre les chimiokines (figure 1.5). Les profils d'activité et les activités de signalisation en aval peuvent varier entre les membres(38). Contrairement à CXCR2, les NAC montrent une gamme d'affinités pour CXCR1 avec le monomère CXCL8 seul montrant l'activité CXCR1 la plus élevée(3,39).

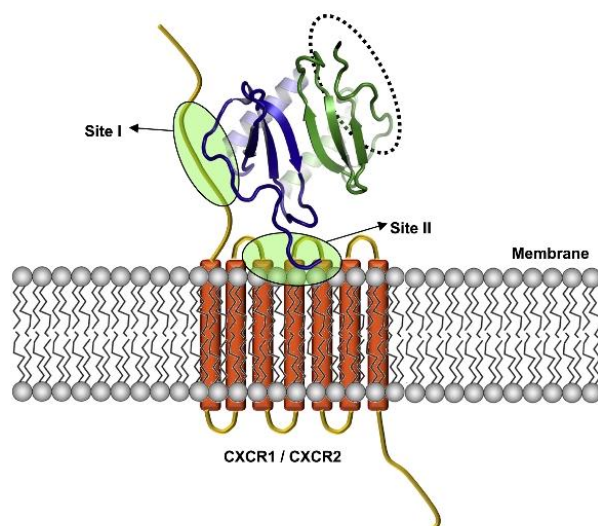


Figure.1.5. complexe chimiokine récepteur (Krishna et al, 2019)

CXCR2 est un récepteur avec une affinité de liaison élevée avec les ligands CXCL1 et CXCL2(36,40). Il est exprimé par les cellules résidentes du système nerveux

central (SNC), y compris les neurones, la microglie, les cellules progénitrices des oligodendrocytes (OPC) et les oligodendrocytes, ainsi que par les neutrophiles et les cellules endothéliales (41). La signalisation CXCR2 est importante dans la régulation de la biologie des OPC en ce qui concerne la migration de position et la myélinisation pendant le développement. Plus récemment, des études ont fait valoir que CXCR2 est impliqué dans le contrôle des événements liés à la remyélinisation après une démyélinisation induite expérimentalement(36).

Les ligands spécifiques de CXCR2 sont sécrétés par de nombreux types de cellules différents, y compris les macrophages, cellules endothéliales, neutrophiles et astrocytes.

1.7.6. Signalisation intracellulaire

Comme tous les récepteurs de chimiokine connus, CXCR2 est de type GPCR. Les chimiokines capables de se lier à CXCR2 contiennent le motif tripeptidique ELR dans leur domaine N-terminal, contrairement aux chimiokines CXC non ELR telles que CXCL12, qui attirent généralement les lymphocytes. Suite à la liaison avec son ligand, CXCR2 active la protéine G via l'hydrolyse des phosphoinositides pour générer du diacylglycérol et de l'inositol 1,4,5-trisphosphate, qui active la protéine kinase C permettant la mobilisation du calcium pour initier les réponses cellulaires (30,31,40). Le complexe ligand-récepteur, après signalisation, est phosphorylé et endocytosé par des voies de signalisations. Ensuite, CXCR2 peut être soit dégradé, soit transporté vers la membrane cellulaire pour la réexpression(31).

2. CXCL2 et l'inflammation

2.1. L'inflammation

L'inflammation est un processus naturel et protecteur résultant d'une agression (allergie, infection, blessure...). Elle a pour objectif de reconnaître, détruire et éliminer toutes les substances qui lui sont étrangères. La réaction inflammatoire dépasse parfois ses objectifs, responsable d'effets délétères, mais il s'agit là du prix que l'organisme doit parfois payer pour assurer le maintien de son intégrité(25,42).

La détection de l'agression par l'organisme entraîne une arrivée massive de cellules immunitaires sur le site concerné. Pour cela, les vaisseaux sanguins de la zone se dilatent et les cellules immunitaires sur place produisent des molécules qui activent et attirent leurs congénères en fonction de la menace identifiée. C'est ce qui cause les rougeurs, gonflements, douleurs et sensation de chaleur souvent présente sur le site de l'inflammation(8,42).

Les cellules immunitaires s'activent les unes les autres par la production des signaux et des molécules lorsqu'elles détectent une menace quelconque, déclenchant notamment l'inflammation(43). Mais certaines personnes souffrent d'une anomalie entraînant une activation chronique des défenses immunitaires, en l'absence de tout danger réel. Ces maladies sont qualifiées d'auto-inflammatoire ou d'auto-immunes, selon le type d'acteurs de l'immunité qui est en cause(40). Ainsi les maladies auto-inflammatoires concernent plus un dysfonctionnement de l'immunité innée, c'est-à-dire les premières lignes de défense du corps dont la nature est similaire quelle que soit la menace. Les maladies auto-immunes, elles, caractérisent plutôt un souci de l'immunité adaptative, celle qui est spécifique du danger en présence et que l'immunité innée active si son action est insuffisante (le principe du vaccin repose sur ce type d'immunité)(42). Parmi les maladies auto-immunes, les plus connues, on cite le diabète de type 1 (DT1), la polyarthrite rhumatoïde et la sclérose en plaque(8,27,44).

2.2. CXCL2 dans l'inflammation

Les chimiokines inflammatoires exercent un effet sur le recrutement et l'adhésion des cellules inflammatoires et peuvent médier l'inflammation qui endommage la barrière vasculaire(figure1.6), conduisant à une expression accrue des facteurs d'adhésion de surface, une perméabilité accrue du système vasculaire, une adhésion et une

agrégation des cellules inflammatoires(5,36). CXCL2 également connu comme produit génique lié à la croissance, joue un rôle très important dans le processus de inflammation blessure réparation et a des fonctions physiologiques importantes, telles que la participation à la réorganisation du cytosquelette, la migration cellulaire, l'adhésion et les réponses immunitaires(45).

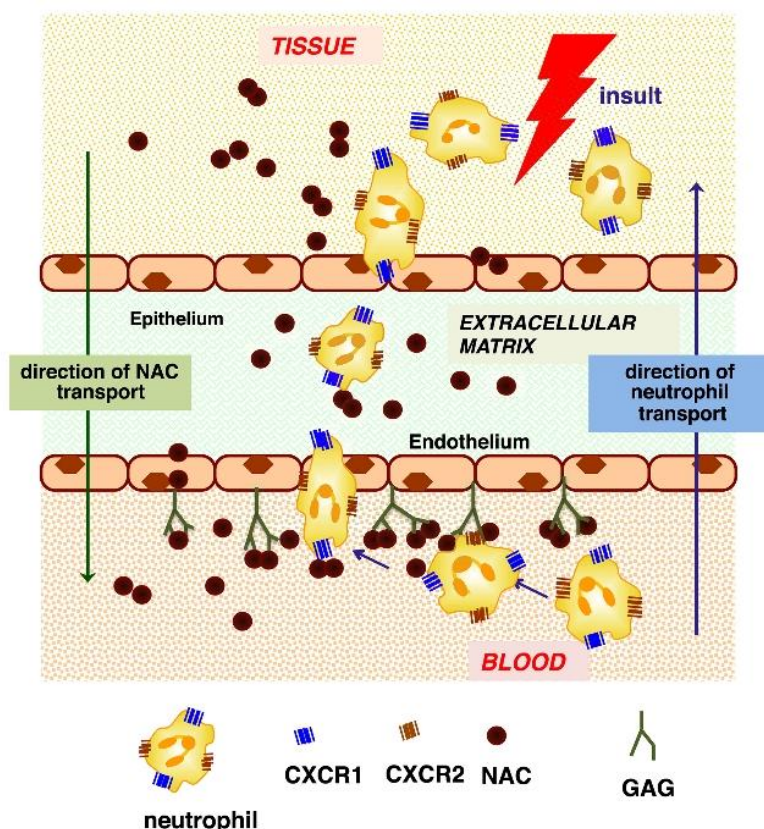


Figure.1.6. le recrutement et l'adhésion des neutrophiles dans l'inflammation (Krishna et al, 2019)

CXCL2 est impliquée dans la progression des maladies cardiovasculaires. Elle agit comme une chimiokine puissante pour le recrutement et l'adhésion des neutrophiles dans l'inflammation, qui contribue à la formation de plaques athérosclérotiques dans l'athérosclérose(3). En outre, dans l'obésité, CXCL2 induit une inflammation chronique qui accélère le processus pathologique de l'athérosclérose. En revanche, la surexpression de CXCL2 dans le myocarde conduit à des dommages de la cellule myocardique, qui a un effet néfaste dans l'infarctus du myocarde. CXCL2 peut recruter directement des neutrophiles et activer les leucocytes. En outre, CXCL2 est également un chimioattractant efficace pour les macrophages et mastocytes (5,37).

CXCL2 accélère le développement de l'obésité a des caractéristiques de réactions inflammatoires chroniques de bas niveau, telles que des niveaux anormaux de

cytokines plasmatiques, augmentation de l'expression du tissu adipeux en phase aiguë, activation des voies de signalisation pro-inflammatoires, et aussi l'inflammation du tissu adipeux dans l'obésité. CXCL2 est également associée à l'apparition et au développement d'obésité (46).

La surexpression de CXCL2 peut provoquer une inflammation, entraînant des lésions cellulaires dont des dommages aux vaisseaux sanguins et une libération des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Donc la suppression de CXCL2 peut réduire ces blessures(5). Il convient de mentionner que les neutrophiles ont deux rôles dans l'expression de CXCL2, y compris autocrine induction de l'expression de CXCL2 et de l'expression induite par CXCL1(47). De plus, l'induction autocrine de l'expression de CXCL2 est inhibée par des concentrations élevées de protéine CXCL2, tandis que l'expression induite par CXCL1 de CXCL2 n'est pas soumise aux contrôles négatifs. De plus, la capacité de CXCL1 à influencer l'expression des neutrophiles de CXCL2 dans un mode monotone peut permettre aux types de cellules sentinelles locales qui détectent l'infection de «régler avec précision» l'ampleur de la réponse des neutrophiles(9,45,48) .

3. CXCL2 et auto-immunité

3.1. Auto immunité et les maladies auto-immunes

Les maladies auto-immunes sont classées selon les organes et tissus visés par la réponse immunitaire. Il existe une maladie auto-immune spécifique à presque tous les organes du corps, impliquant généralement une réponse à un antigène exprimé uniquement dans cet organe (49,50). Dans d'autres maladies auto-immunes, telles que le lupus érythémateux systémique, aucun type de cellule particulier ne semble être ciblé; la réponse semble plutôt être dirigée contre l'antigène largement exprimés dans tout l'hôte(49).

Les maladies auto-immunes sont contrôlées par des facteurs génétiques et environnementaux. Ces deux facteurs affectent la sensibilité à l'auto-immunité à trois niveaux: la réactivité globale du système immunitaire, l'antigène spécifique et sa présentation (50). Les facteurs génétiques et environnementaux peuvent augmenter la sensibilité à l'auto-immunité en affectant la réactivité globale et la qualité des cellules du système immunitaire. De plus, ils contrôlent quels antigènes, et donc quels organes seront les cibles de l'immunité attaque. La spécificité de l'antigène et l'organe est affectée par la présentation et la reconnaissance de l'antigène, l'expression de l'antigène et l'état et la réponse des organes cibles (49).

Ces maladies sont spécifiques des antigènes et des auto-anticorps dirigés vers les antigènes du soi. La reconnaissance d'antigènes largement exprimés entraîne parfois de manière inattendue des manifestations sélectives d'organe. Les lésions auto-immunes des organes peuvent être médiées par les cellules T, comme dans la sclérose en plaques (SEP), le diabète de type 1 et la maladie d'Addison et CD4 + et / ou les cellules T CD8 + peuvent jouer un rôle crucial. Dans ces maladies, des auto-anticorps sont également produits et servent de marqueurs des réponses des lymphocytes T spécifiques de l'antigène, par exemple, sous forme d'anticorps contre l'insuline ou d'autres antigènes de cellules d'îlots pancréatiques dans diabète de type 1 (49,50).

3.2. Rôle de CXCL2 dans l'auto immunité

Il existe une association de CXCL1 et CXCL2 avec divers maladies, y compris le DT1 (51). La régulation transcriptionnelle des gènes *CXCL1* et *CXCL2* par IL-1 est susceptible de représenter un élément essentiel sous-jacent de l'inflammation

cellulaire. L'approche de la biologie des systèmes indique un lien fort entre IL-1 / NF-B et CXCL1 / 2 dans les maladies auto-immunes (51).

CXCL1 et CXCL2 sont capables d'attirer les cellules CXCR2, telles que les neutrophiles, aux sites d'inflammation (52). Les neutrophiles participent à l'initiation du processus à médiation auto-immune qui se traduit par une diminution de la masse cellulaire fonctionnelle (53). Cependant, on ne sait pas encore comment différents leucocytes collaborent pour initier le processus auto-immun. L'initiation de auto-immunité et / ou poursuite de la réponse auto-inflammatoire qui conduit à la destruction des cellules peut nécessiter la synthèse et la sécrétion de chimiokines telles que CXCL1 et CXCL2, directement à partir des cellules d'îlots. Ces protéines chemoattractants recrutent les cellules qui commencent (ou maintiennent) le processus inflammatoire, conduisant finalement à l'apparition et à la progression de l'auto-immunité (53,54). En effet, les cellules de rongeurs et les cellules humaines fabriquent et sécrètent CXCL1 et CXCL2 qui se lient à CXCR2 pour initier l'activation et la migration des neutrophiles. Bien que très efficace contre CXCL1 recombinante seul, l'inhibiteur allostérique de CXCR2 ne bloque pas entièrement la réponse migratoire aux surnageants de cellules. Il y'a des interprétation qui indiquent qu'il peut y avoir des chimiokines capables d'activer ou de recruter des neutrophiles indépendamment de CXCR2 (49,50).

En raison des nombreuses populations de leucocytes qui participent à la destruction cellulaire à médiation auto-immune, il peut y avoir des effets additifs ou synergiques entre plusieurs chimiokines et / ou DAMP sur le recrutement, l'activation des cellules immunitaires, et la libération de molécules cytotoxiques (54,55).

Les maladies auto-immunes sont souvent classées comme systémiques, telles que la polyarthrite rhumatoïde ou spécifique à un organe, comme le DT1 (49). Les deux types de maladies auto-immunes proviennent d'un ciblage inapproprié des cellules immunitaires d'un tissu du soi. Dans le cas du DT1, l'infiltration de leucocytes dans les îlots pancréatiques culmine avec la destruction des cellules productrices d'insuline (50). Cette perte de masse fonctionnelle des cellules des îlots conduit aux symptômes cliniques associés au DT1. L'éradication des cellules des îlots nécessite plusieurs types de cellules immunitaires, les lymphocytes T et les macrophages étant parmi les contributeurs les plus connus au D T1 (54–56). L'accumulation de ces cellules immunitaires des îlots pancréatiques est appelée insulite et est une caractéristique du DT1 (56,57). Elle commence à être reconnue dans la surcharge lipidique et le DT2. L'invasion des cellules immunitaires dans les îlots pancréatiques

de Langerhans, conduit finalement à la destruction sélective de la production d'insuline (58,59).

Bien que cela semble initialement contredire le rôle des neutrophiles dans le DT1, il existe une augmentation des neutrophiles dans le pancréas. Une explication de la perte de PBN en circulation est qu'ils se sont extravasés de la circulation sanguine dans le pancréas en réponse à une synthèse et à une sécrétion élevées de CXCL1 et CXCL2. L'expression de CXCL1 et CCL2 est augmentée dans les îlots de modèles génétiques d'obésité et de diabète (59).

4. CXCL2 et immunité anti infectieuse

4.1. Principe général de la réponse immunitaire anti infectieuse

La réponse immunitaire anti infectieuse repose sur deux phases successives et indépendantes: la réponse innée et la réponse adaptative. La réponse immunitaire innée représente la première ligne de défense contre les microorganismes pathogènes. Elle met en jeu de façon très rapide des mécanismes de défenses non spécifiques : production de peptides antimicrobiens agissant directement contre les pathogènes, de cytokines et chimiokines permettant le recrutement et l'activation de cellules immunitaires effectrices (monocytes/macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques et cellules lymphoïdes innées), ainsi que de protéines du complément et opsonines facilitant la phagocytose et l'élimination des pathogènes par les cellules effectrices innées(42,60,61).

A l'inverse, la réponse adaptative se développe plus tardivement, généralement entre 3 et 15 jours suivant l'infection, et est initiée par la réponse innée via les cellules présentatrices d'antigènes. Ces dernières, représentées majoritairement par les cellules dendritiques (DC), permettent la sélection de clones de lymphocytes T spécifiques du pathogène par la présentation à leur surface de peptides microbiens liés au complexe majeur d'histocompatibilité de type 2 (CMH II)(42,44,62). Ces clones vont alors proliférer et combattre les pathogènes par des mécanismes cytotoxiques pour les lymphocytes T (notamment en détruisant les cellules infectées par des pathogènes intracellulaires), ou, pour les lymphocytes B, par la production d'anticorps neutralisants ou opsonisants qui vont se fixer à la surface des bactéries ou toxines bactériennes pour faciliter leur élimination. De plus, cette réponse adaptative s'accompagne de la production de lymphocytes B et T mémoires qui permettent une protection à long terme contre les réinfections par les pathogènes présentant les mêmes antigènes(42,63).

4.2. CXCL2 dans l'immunité anti infectieuse

Les chimiokines jouent un rôle crucial dans la lutte contre les infections microbiennes et l'initiation de la réparation des tissus par recrutement des neutrophiles. Les humains expriment sept chimiokines (CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 et CXCL8) et deux des récepteurs (CXCR1 et CXCR2) médient les fonctions des neutrophiles (3,29). Les chimiokines activant les neutrophiles qui constituent le

plus grand sous-ensemble de leucocytes circulants, fonctionnent comme les premiers répondeurs contre les infections microbiennes et les lésions tissulaires (64). Ces chimiokines existent de manière réversible sous forme de monomères et de dimères, et leur liaison au récepteur déclenche des changements conformationnels (3).

En plus de déclencher la signalisation, la chimiokine entraîne également une internalisation du récepteur qui varie entre le monomère et le dimère et entre CXCR1 et CXCR2 (36). Par conséquent, les niveaux de récepteur au site infecté seront différents et le rôle des deux récepteurs en termes de libération de granules et de superoxyde pour la destruction microbienne est également différent. Les changements phénotypiques ultérieurs qui impliquent des interactions avec les macrophages et les monocytes favorisent la phagocytose, l'apoptose, l'efférocytose et la clairance(27,31,34).

La capacité des NAC à exister de manière réversible en tant que monomères et dimères doit conférer des avantages par rapport au fait d'exister comme l'un ou l'autre seul. La réponse immunitaire de l'hôte lors d'une infection active est un processus complexe et le processus de recrutement des neutrophiles doit être coordonné avec la régulation au niveau des voies de chimiokines, de récepteur et de signal(1,3,65).

4.3. Recrutement des neutrophiles par CXCL2

La capacité d'exister en tant que monomères et dimères et les interactions avec les GAG régulent les niveaux de chimiokines libres disponibles et la nature des gradients qui dirigent les neutrophiles du sang vers le tissu infecté à travers l'endothélium. Ces chimiokines présentent une diversité de liaison aux GAG de surfaces, indiquant l'emplacement et la distribution des résidus conservés et spécifiques aux chimiokines dans le contexte de la structure tridimensionnelle et détermine la géométrie de liaison(3,66) . Pour toutes les chimiokines, on observe que le dimère par rapport au monomère lie les GAG avec une affinité plus élevée. Pour les chimiokines CXCL7 et CXCL8, la liaison du monomère et du dimère à l'héparine GAG, et la surface de liaison d'un monomère est similaire au monomère dans le dimère (66,67).

Le recrutement et l'activité des monomères et des dimères peut être distincte, le monomère ou le dimère peut être plus actif que la protéine native (dont l'activité est un composé à la fois de monomère et de dimère), et que l'équilibre monomère-dimère régule le recrutement(68). A faibles doses, ce qui pourrait correspondre aux stades très précoces ou tardifs du recrutement, le monomère est plus actif que le dimère. Au plus haut doses, le recrutement des neutrophiles médié par les dimères pourrait être assez robuste, suggérant des actes de dimérisation comme un interrupteur(69,70). Cependant, des niveaux de dimères élevés persistants ne sont pas souhaitables, car ils pourraient entraîner un recrutement massif et une réponse inflammatoire galopante. D'autre part, les monomères à des doses élevées entraînent une réduction du recrutement qui pourrait être attribuée à des niveaux de récepteurs réduits et des gradients sous-optimaux(71).

Les concentrations de chimiokine sont faibles dans le sang à distance du site d'infection et de blessure et relativement hautes sur le site de la lésion. Par conséquent, les activités in vitro mesurées à de faibles concentrations pourraient refléter des événements de signalisation qui se produisent dans le sang tôt après l'infection et à des concentrations élevées reflètent les événements de signalisation qui se produisent au site d'infection. CXCR2 joue un rôle central dans la direction du recrutement des neutrophiles (42,69). Sur le site de l'infection ou de la blessure, CXCR2 n'est plus disponible en raison de son endocytose rapide à haute concentrations des chimiokines, et CXCR1 jouerait un rôle actif dans le déclenchement des réponses pro-inflammatoires (3,48).

A tout moment, les NAC existent en équilibre dynamique entre quatre formes : monomère dans la forme libre et liée au GAG et dimère sous la forme libre et liée au GAG. Les neutrophiles sont rapidement recrutés après une lésion et continuent à être recrutés pendant de nombreuses heures pour une réponse aiguë et pendant des périodes encore plus longues lors d'états inflammatoires chroniques. Cependant, trop de neutrophiles ou leur recrutement excessif peuvent causer des lésions tissulaires collatérales et des maladies (72). Donc Il n'est pas surprenant que le recrutement altéré de trop peu de neutrophiles sur le site de la lésion entraîne une inflammation incontrôlable. Des taux élevés de chimiokines dans le sang provoquent une désensibilisation des récepteurs et un recrutement altéré, et une accumulation de neutrophiles sur le côté luminal de l'endothélium ou de l'épithélium(73).

5. La Polymérase chaine réaction

5.1. Définition

C'est une méthode révolutionnaire développée par Kary Mullis dans les années 1980. La PCR est une technique d'amplification enzymatique basée sur l'utilisation de la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser un nouveau brin d'ADN complémentaire du brin matrice proposé. Cet outil devenu fondamental pour les recherches biomédicales pour avoir la capacité à produire une grande quantité d'ADN ou bien la détection à partir d'une petite amorce(74,75).

5.2. Principe

La technique du PCR consiste à amplifier une région spécifique de l'ADN in vitro pour obtenir une quantité suffisante pour la détecter et l'étudier.

5.3. Etapes de la PCR

Une PCR se réalise en trois étapes :

- **Etape1** :(dénaturation) les deux brins d'ADN sont séparés pendant 5 minutes (95°C).
- **Etape 2** :(Hybridation) : température (50-70 °C), les amorces sont constituées de courts fragments d'ADN et viennent s'hybrider sur les brins d'ADN,
- **Etape 3** :(Elongation) : une enzyme polymérase, la Taq polymérase, complète la synthèse du brin d'ADN à partir de l'amorce grâce aux oligonucléotides présents pour l'élongation de nouveaux brins complémentaires.

6. problématique et objectif

Problématique

Les maladies infectieuses, les maladies inflammatoires ainsi que les maladies auto-immunes sont des problèmes de santé courants, souvent graves, qui provoquent la réponse immunitaire cellulaires et humorale. Le processus inflammatoire qui constitue le point commun de ces maladies, est fortement lié à la présence des chimiokines qui sont responsables des symptômes engendrés par l'inflammation. De nombreuses études ont soulevé le rôle déterminant de la CXCL2 dans la pathogénèse de ces maladies.

But

Montrer que la CXCL2 joue un rôle clé dans l'immunité anti infectieuse, les maladies inflammatoires, et les maladies auto-immunes.

Objectif

Choisir le bon couple d amorces pour le Primer Blast qui assure l'amplification de la PCR qui fait l'intérêt de notre étude concernant le gène cxcl2, une chimiokine qui impliqué dans l'inflammation, l'auto immunité et l'immunité anti infectieuse.

Chapitre2 : matériels et méthodes

1. Conception d'amorce

La conception des amorces est considérée comme le paramètre le plus important pour le succès de la PCR. En effet, une amorce mal conçue peut empêcher le fonctionnement de la réaction PCR. Lors de la conception d'un ensemble d'amorces dans une région spécifique de l'ADN souhaité pour l'amplification, une amorce doit s'hybrider au brin plus, qui par convention est orienté dans la direction 5' → 3' (également connu comme le brin sens ou non modèle) et l'autre amorce doit compléter le brin moins, qui est orienté dans la direction 3' → 5'(anti sens). Des amorces correctement validées sont cruciales pour déterminer la spécificité, la sensibilité et la robustesse d'une réaction de PCR(76,77).

Une amorce mal conçue peut conduire à une production faible, voire nulle, en raison d'une amplification non spécifique et/ou à la formation de dimères d'amorce, qui peuvent devenir suffisamment compétitifs pour inhiber la formation du produit d'amplification (75,76).

Il y a quelques problèmes courants qui se posent lors de la conception des amorces:

- Auto-hybridation avec les amorces entraînant la formation de structures secondaires telles que des boucles en épingle à cheveux.
- hybridation des amorces à l'autre, plutôt que de la matrice d'ADN, la création d'amorce dimères
- Des températures de fusions (T_m) différentes pour chaque amorce, ce qui rend difficile de sélectionner une température de recuit(78).

2. La sélection d'amorce

Plusieurs variables doivent être prises en considération lors de la conception des amorces pour la PCR. Voici quelques-unes des plus importantes:

2.1. La spécificité

La spécificité de l'amorce est la fréquence des événements d'amorçage appropriés. Elle dépend au moins partiellement de la longueur de l'amorce (79)

Les amorces doivent être choisies de telle sorte qu'elles aient une séquence unique dans l'ADN matrice qui doit être amplifié. Une amorce conçue avec une séquence

hautement répétitive conduira à une traînée lors de l'amplification d'ADN génomique. En général, la température de fusion de 55 à 72 °C donne les meilleurs résultats(74).

2.2. L'efficacité

C'est l'augmentation du produit à chaque cycle de PCR. L'optimum théorique est une multiplication par deux. L'application détermine l'équilibre entre ces paramètres. Par exemple, dans le diagnostic, l'efficacité est sacrifiée pour une spécificité, minimisant les faux positifs pour un coût moindre du produit PCR.

-Plus l'apprêt est court, plus le recuit avec le gabarit est rapide et plus la spécificité est faible. Par conséquent, les amorces de moins de 18 nucléotides de longueur sont susceptibles de mal fonctionner avec des modèles complexes.

- Plus l'apprêt est long, plus l'efficacité est faible (une petite inefficacité propagée avec le nombre de cycles). Cependant, un apprêt plus long conduit à une spécificité plus élevée en raison de la longueur de l'amorce (4 fois par base ajoutée) et sa température de fusion(74–76).

En résumé, l'utilisation d'amorces d'une longueur minimale garantissant $T_m > 54$ C est recommandée pour équilibrer la spécificité et l'efficacité en général conditions (76).

2.3. Longueur

Ce paramètre est essentiel pour le succès de la PCR. En général, Lors d'une technique PCR, la spécificité est généralement contrôlée par la longueur de l'amorce et la température d'hybridation de la réaction PCR et pour un meilleur résultat la longueur idéale de l'amorce doit être de 15 à 30 bases (80)

La longueur de l'amorce est également proportionnelle à l'efficacité de l'hybridation. L'objectif est de concevoir une amorce dont la température d'hybridation est d'au moins 50 °C. Plus l'amorce est longue, moins l'hybridation est efficace. Le nombre de matrices amorcées diminuant à chaque étape, cela peut aboutir à une diminution sensible du produit amplifié(76,77).

2.4. Température de fusion

En général, une température de fusion de 55–72 °C donne les meilleurs résultats. Elle correspond à une longueur d'amorce de 18–24 bases (80).

La différence de température de fusion (T_f) entre le modèle et l'amorce moins stable est un facteur clé pour la PCR. Il est important de se rappeler que deux amorces sont ajoutées à une PCR dirigée sur un site ou une cible. Les deux amorces d'oligonucléotides doivent être conçues de sorte qu'elles aient des températures de fusion semblables. Si les amorces ne concordent pas en termes de T_f , l'amplification sera moins efficace ou peut ne pas fonctionner du tout, car l'amorce avec la T_f la plus élevée va mésamorcer aux basses températures et l'amorce avec la T_f plus basse peut ne pas fonctionner aux hautes températures(76).

Le plus simple est d'utiliser les logiciels de conception d'amorces déjà disponibles sur le marché. Les T_m finales pour les deux amorces ne doivent pas différer de plus de 5 °C(75,76).

2.5. Teneur en GC

Teneur en G/C et suites polypyrimidine (T, C) ou polypurine (A, G)

Les amorces devraient être composées à 45-55 % de GC. La séquence d'amorce doit être choisie de telle sorte qu'il n'y ait aucune suite poly-G ou poly-C pouvant promouvoir une hybridation non spécifique. Les suites poly-A et poly-T doivent également être évitées, car elles «respireront» et ouvriront des parties du complexe amorce-matrice. Cela peut réduire l'efficacité de l'amplification. (79).

Les suites polypyrimidine (T, C) et polypurine (A, G) devraient également être évitées.

Idéalement, l'amorce présentera un mélange presque aléatoire de nucléotides, une teneur de 50 % en GC et une longueur d'environ 20 bases(78). (Dieffenbach et al., 1995).

L'efficacité de La «respiration» de l'ADN se produit lorsque les extrémités ne restent pas recuites mais s'effilochent ou se séparent. Les trois liaisons hydrogène dans les paires GC aident à empêcher la respiration mais aussi à augmenter la température de fusion des amorces. Il faut éviter également les courses de mononucléotides de plus de 4 nucléotides (par exemple, GGGG) et des répétitions de plus de 4 dinucléotides (par exemple, ATATATAT), car ils peuvent provoquer un mauvais amorçage et un glissement de la polymérase(74–76,78).

2.6. La séquence à l'extrémité 3'

Il est établi que la position terminale 3' dans les amorces PCR est essentielle pour empêcher le mésamorçage. Le problème des homologies d'amorce se produisant dans ces régions a déjà été examiné.

La conception des amorces proches du 3'-end est suggérée pour éviter la sous-estimation de la concentration cible. C'est pour cela que la présence des bases G et C contenant des triples liaisons hydrogéniques assurent la meilleure amplification(74,76).

2.7. Séquences d'amorce complémentaire

Les amorces doivent être conçues absolument sans aucune homologie intra-amorce au-delà de 3 paires de bases. Si une amorce possède une telle région d'auto-homologie, des structures partiellement doubles brin en «épingles à cheveux» peuvent se former(77).

Un autre risque connexe est l'homologie inter-amorce. L'homologie partielle dans les régions centrales de deux amorces peut interférer avec l'hybridation. Si l'homologie se situe à l'extrémité 3' de l'une ou de l'autre amorce, la formation de dimères d'amorce se produira, ce qui, par compétition, empêchera le plus souvent la formation du produit désiré(74,78).

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 complémentaire d'autres séquences de l'amorce. Ces deux scénarios entraînent la formation des structures de boucles en épingle à cheveux et des dimères d'amorce (80).

3. La séquence du gène CXCL2

La conception des amorces qui encadrent le cxcl2 commence par la recherche de la séquence de ce gène cxcl2. Nous avons utilisé la banque des gènes <www.Ensembl.org> comme base de données comme le montre la (figure 2.1).

3.1. Le design de primer

L'outil primer est accessible à travers le centre national de l'information biotechnologique (NCBI) sur le site « www. Ncbi. nlm. nih. Gov » qui est utilisé dans notre étude pour trouver une conception d'amorces les plus spécifiques de la séquence que l'on veut amplifier.

Notre choix d'amorce doit prendre en compte les conditions précédemment mentionnées, et donc pour assurer l'amplification du produit spécifique désiré il faut cibler l'amorce avec le moins de produits aspécifiques.

Ensuite on va copier l'amorce choisie dans primer blast en ajustant les paramètres afin de réaliser la conception (figure2.3).

The screenshot shows the Primer-BLAST web interface. At the top, it says 'Primer-BLAST' and 'A tool for finding specific primers'. Below that, it says 'Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST)'. There are links for 'Primers for target on one template' and 'Primers common for a group of sequences'. The main interface has a 'PCR Template' section with a text area containing a DNA sequence and a 'Range' section with 'Forward primer' and 'Reverse primer' fields. The 'Reverse primer' field is highlighted with a red box, showing the value '747'. Below this is the 'Primer Parameters' section with various input fields for primer design, including 'PCR product size', '# of primers to return', and 'Primer melting temperatures (Tm)'. The 'Reverse primer' field is highlighted with a red box, showing the value '747'.

Figure.2.3. Analyse de la séquence d'intérêt par Primer blast

3.2. Les caractéristiques d'une bonne amorce

- L'amorce spécifiée doit contenir un nombre de bases inférieur à 1 000 car la PCR ne peut pas amplifier une séquence comportant plus de 1 000 bases.
- La teneur en GC doit avoisiner les 40%.
- Les températures d'hybridation de l'amorce (sens et anti sens) doivent être équivalentes. Pendant la réalisation de la PCR, la température d'hybridation est stable à une seule valeur.

- Tous les produits aspécifiques résultants appartenant à l'amorce souhaitée doivent contenir plus des 1000 bases

Chapitre3 : résultats

Les résultats sont obtenus par primer blast (figure2.4) et (figure2.5).

Primer pair 4										
	Sequence (5'>3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity	
Forward primer	CCATCGCCTTCCTCCGAAC	Plus	20	3	22	61.09	60.00	5.00	3.00	
Reverse primer	CCTCTGGCACCAGAACAGAT	Minus	20	886	867	59.38	55.00	8.00	2.00	
Product length	884									
Products on potentially unintended templates										
>NC_000004.12 Homo sapiens chromosome 4, GRCh38.p13 Primary Assembly										
product length = 884										
Features associated with this product:										
C-X-C motif chemokine 2_orecursor										
Forward primer	1	CCATCGCCTTCCTCCGAAC	20							
Template	74099314T.....	74099295							
Reverse primer	1	CCTCTGGCACCAGAACAGAT	20							
Template	74098431T.....	74098450							
>NC_000002.12 Homo sapiens chromosome 2, GRCh38.p13 Primary Assembly										
product length = 1643										
Features associated with this product:										
inositol polyphosphate-4-phosphatase type I A isoform e										
inositol polyphosphate-4-phosphatase type I A isoform XI1										
Reverse primer	1	CCTCTGGCACCAGAACAGAT	20							
Template	98576499TT.....T.....C	98576480							
Reverse primer	1	CCTCTGGCACCAGAACAGAT	20							
Template	98574857	..C...T.....A	98574876							
>NC_000023.11 Homo sapiens chromosome X, GRCh38.p13 Primary Assembly										
product length = 1207										
Features associated with this product:										

Figure.2.4. Résultats de la conception sur primer blast (partie1)

product length = 1207										
Features associated with this product:										
zinc finger C4H2 domain-containing protein isoform 3										
zinc finger C4H2 domain-containing protein isoform 1										
Reverse primer	1	CCTCTGGCACCAGAACAGAT	20							
Template	64940778	GTA....T....A.....	64940759							
Reverse primer	1	CCTCTGGCACCAGAACAGAT	20							
Template	64939572	.TA....T....A.....	64939591							
product length = 3517										
Features flanking this product:										
213016_bp_at_5'_side_ofchrin-81_orecursor										
23114_bp_at_3'_side_ofuncharacterized protein LOC105373242 isoform X1										
Reverse primer	1	CCTCTGGCACCAGAACAGAT	20							
Template	69057185	GTA....T....A.....	69057166							
Reverse primer	1	CCTCTGGCACCAGAACAGAT	20							
Template	69053669	GTA....T....A.....	69053688							
>NC_000019.10 Homo sapiens chromosome 19, GRCh38.p13 Primary Assembly										
product length = 1991										
Features flanking this product:										
46548_bp_at_5'_side_ofgalactoside-binding soluble lectin 13 isoform X3										
93_bp_at_3'_side_oflectin-16										
Reverse primer	1	CCTCTGGCACCAGAACAGAT	20							
Template	39655860T...TTC.....	39655849							
Reverse primer	1	CCTCTGGCACCAGAACAGAT	20							
Template	39653878	ATA....T....A.....	39653897							
>NC_000014.9 Homo sapiens chromosome 14, GRCh38.p13 Primary Assembly										
product length = 2783										

Figure.2.5. Résultats de la conception sur primer blast (partie2)

D'après « Ensemble .org » le gène de CXCL2 est composé de 2 exons et 3 introns.

Dans notre recherche nous ciblons l'exon 1 précisément lorsque l'autre exons induite l'amplification des produits aspécifiques de moins 1000 paires de bases résultants des séquences du gène CXCL2 non désiré et non spécifique surtout .

La température de fusion de cette amorce est environ 59 c° donnera un meilleur résultat pour une longueur de 20 nucléotides, une teneur en GC située entre 40 à 60 % ce qui augmente la spécificité ainsi que l'efficacité de l'amplification (figure2.6).

Primer pair 4		Sequence (5'>3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer		CCATCGCCTTCCTCCGAAC	Plus	20	3	22	61.09	60.00	5.00	3.00
Reverse primer		CCTCTGGCACCAGAACAGAT	Minus	20	886	867	59.38	55.00	8.00	2.00
Product length	884	taille de produit spécifique								
Products on potentially unintended templates										
>NC_000004.12 Homo sapiens chromosome 4, GRCh38.p13 Primary Assembly										
product length = 884										
Features associated with this product:										
C-X-C motif chemokine 2 precursor										
Forward primer	1	CCATCGCCTTCCTCCGAAC	20							
Template		74899314							74899295
Reverse primer	1	CCTCTGGCACCAGAACAGAT	20							
Template		74898431							74898458
>NC_000002.12 Homo sapiens chromosome 2, GRCh38.p13 Primary Assembly										
product length = 1643										
Features associated with this product:										
Inositol polyphosphate-4-phosphatase type I A isoform e										
Inositol polyphosphate-4-phosphatase type I A isoform XI1										
Reverse primer	1	CCTCTGGCACCAGAACAGAT	20							
Template		98576499TT.....T.....C							98576488
Reverse primer	1	CCTCTGGCACCAGAACAGAT	20							
Template		98574857	..C...T.....A							98574876
>NC_000023.11 Homo sapiens chromosome X, GRCh38.p13 Primary Assembly										
product length = 1207										
Features associated with this product:										

Figure.2.6.les caractéristiques de l'amorce obtenue

1. Confirmation des résultats

La dernière étape de confirmation des résultats se fait par le logiciel « PCR In Silicon » via le site <https://genome.ucsc.edu/>. Nous avons pu confirmer l'emplacement de notre produit spécifique sur le chromosome 4, ce qui prouve la spécificité de ces amorces (figure 2.7)et (figure 2.8).

Chapire4 : conclusion

CXCL2 est une petite cytokine appartenant à la famille des chimiokines CXC et intervient dans les problèmes de santé publique mondiale telle que les maladies inflammatoire, auto-immunitaire, et infectieuse.

Ces chimiokines induisent l'inflammation, l'adhésion et la migration des neutrophiles aux cellules épithéliales à travers l'endothélium et interagissent avec CXCR1 et CXCR2 .Ces chimiokines ont aussi un rôle angiogénique puisqu'elles sont chimioattractantes pour les cellules endothéliales.

Pour mieux comprendre le mécanisme et le rôle de cette chimiokine en utilise des techniques de biotechnologie comme la PCR pour étudier l'impact de chimiokine CXCL2 sur cette maladie.

La PCR réalisée pour étudier le gène qui code pour CXCL2, demande des paires d'amorces correspondant aux critères proposés afin de les mettre pour la conception dans le primer blast qui assure la meilleur amplification des séquences cibles.

Le blocage de chimiokines CXCL2 ou son récepteur peut devenir une thérapeutique ciblé pour la lutte contre différents maladies inflammatoire et auto immunitaire ainsi que les maladies infectieuse.

Le contrôle des niveaux d'expression des récepteurs de chimiokines CXCL2 (CXCR2et CXCR1) ou bien le dosage de CXCL2 elle-même dans le sang peut moduler la réaction immunitaire et peut aussi devenir une thérapeutique ciblé pour les maladies de la santé publique

Chapitre 5 : Références bibliographiques

1. Nesmelova IV, Sham Y, Gao J, Mayo KH. CXC and CC chemokines form mixed heterodimers: association free energies from molecular dynamics simulations and experimental correlations. *J Biol Chem*. 2008 Aug 29;283(35):24155–66.
2. Bièche I, Chavey C, Andrieu C, Busson M, Vacher S, Le Corre L, et al. CXC chemokines located in the 4q21 region are up-regulated in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2007 Dec;14(4):1039–52.
3. Krishna R, Schnoor M, Richardson RM, Rajagopal S. How do chemokines navigate neutrophils to the target site: Dissecting the structural mechanisms and signaling pathways. *Cellular Signalling*. 2019 Feb;54:69–80.
4. Rittner HL, Labuz D, Richter JF, Brack A, Schäfer M, Stein C, et al. CXCR1/2 ligands induce p38 MAPK-dependent translocation and release of opioid peptides from primary granules in vitro and in vivo. *Brain Behav Immun*. 2007 Nov;21(8):1021–32.
5. Guo L-Y, Yang F, Peng L-J, Li Y-B, Wang A-P. CXCL2, a new critical factor and therapeutic target for cardiovascular diseases. *Clin Exp Hypertens*. 2020 Jul 3;42(5):428–37.
6. Zlotnik A, Yoshie O. The chemokine superfamily revisited. *Immunity*. 2012 May 25;36(5):705–16.
7. Sepuru KM, Poluri KM, Rajarathnam K. Solution structure of CXCL5--a novel chemokine and adipokine implicated in inflammation and obesity. *PLoS ONE*. 2014;9(4):e93228.
8. Qin C-C, Liu Y-N, Hu Y, Yang Y, Chen Z. Macrophage inflammatory protein-2 as mediator of inflammation in acute liver injury. *World J Gastroenterol*. 2017 May 7;23(17):3043–52.
9. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000 Feb;12(2):121–7.
10. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem*. 1995 Nov 10;270(45):27348–57.
11. Cole KE, Strick CA, Paradis TJ, Ogborne KT, Loetscher M, Gladue RP, et al. Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J Exp Med*. 1998 Jun 15;187(12):2009–21.
12. Sleeman MA, Fraser JK, Murison JG, Kelly SL, Prestidge RL, Palmer DJ, et al. B cell- and monocyte-activating chemokine (BMAC), a novel non-ELR alpha-chemokine. *Int Immunol*. 2000 May;12(5):677–89.
13. Gengrinovitch S, Greenberg SM, Cohen T, Gitay-Goren H, Rockwell P, Maione TE, et al. Platelet factor-4 inhibits the mitogenic activity of VEGF121 and VEGF165 using several concurrent mechanisms. *J Biol Chem*. 1995 Jun 23;270(25):15059–65.

14. Luster AD, Rothenberg ME. Role of the monocyte chemoattractant protein and eotaxin subfamily of chemokines in allergic inflammation. *J Leukoc Biol.* 1997 Nov;62(5):620–33.
15. Forssmann U, Ugucioni M, Loetscher P, Dahinden CA, Langen H, Thelen M, et al. Eotaxin-2, a novel CC chemokine that is selective for the chemokine receptor CCR3, and acts like eotaxin on human eosinophil and basophil leukocytes. *J Exp Med.* 1997 Jun 16;185(12):2171–6.
16. von Andrian UH, Mempel TR. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol.* 2003 Nov;3(11):867–78.
17. Imai T, Yoshida T, Baba M, Nishimura M, Kakizaki M, Yoshie O. Molecular cloning of a novel T cell-directed CC chemokine expressed in thymus by signal sequence trap using Epstein-Barr virus vector. *J Biol Chem.* 1996 Aug 30;271(35):21514–21.
18. Vicari AP, Figueroa DJ, Hedrick JA, Foster JS, Singh KP, Menon S, et al. TECK: a novel CC chemokine specifically expressed by thymic dendritic cells and potentially involved in T cell development. *Immunity.* 1997 Aug;7(2):291–301.
19. Zavala-Flores LM, Villatoro-Hernandez J, Gamez-Escobedo A, Franco-Molina M, Rangel-Colmenero BR, Villanueva-Olivo A, et al. Production of biologically active human lymphotactin (XCL1) by *Lactococcus lactis*. *Biotechnol Lett.* 2009 Feb;31(2):215–20.
20. Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, Kleyensteuber S, Largaespada DA, Jenkins NA, et al. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science.* 1994 Nov 25;266(5189):1395–9.
21. Huang H, Xiang J. Synergistic effect of lymphotactin and interferon gamma-inducible protein-10 transgene expression in T-cell localization and adoptive T-cell therapy of tumors. *Int J Cancer.* 2004 May 10;109(6):817–25.
22. Nguyen KD, Fohner A, Booker JD, Dong C, Krensky AM, Nadeau KC. XCL1 enhances regulatory activities of CD4⁺ CD25(high) CD127(low/-) T cells in human allergic asthma. *J Immunol.* 2008 Oct 15;181(8):5386–95.
23. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature.* 1997 Feb 13;385(6617):640–4.
24. Rimaniol A-C, Till SJ, Garcia G, Capel F, Godot V, Balabanian K, et al. The CX3C chemokine fractalkine in allergic asthma and rhinitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Dec;112(6):1139–46.
25. Wolpe SD, Cerami A. Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: members of a novel superfamily of cytokines. *FASEB J.* 1989 Dec;3(14):2565–73.
26. Kollmar O, Menger MD, Schilling MK. Macrophage inflammatory protein-2 contributes to liver resection-induced acceleration of hepatic metastatic tumor growth. *World J Gastroenterol.* 2006 Feb 14;12(6):858–67.

27. Ohno Y, Lee J, Fusunyan RD, MacDermott RP, Sanderson IR. Macrophage inflammatory protein-2: chromosomal regulation in rat small intestinal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997 Sep 16;94(19):10279–84.
28. Tsutsui H, Nishiguchi S. Importance of Kupffer cells in the development of acute liver injuries in mice. *Int J Mol Sci*. 2014 May 5;15(5):7711–30.
29. De Filippo K, Henderson RB, Laschinger M, Hogg N. Neutrophil Chemokines KC and Macrophage-Inflammatory Protein-2 Are Newly Synthesized by Tissue Macrophages Using Distinct TLR Signaling Pathways. *J Immunol*. 2008 Mar 15;180(6):4308–15.
30. Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:659–702.
31. Semple BD, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC. Role of chemokines in CNS health and pathology: a focus on the CCL2/CCR2 and CXCL8/CXCR2 networks. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010 Mar;30(3):459–73.
32. Amanzada A, Moriconi F, Mansuroglu T, Cameron S, Ramadori G, Malik IA. Induction of chemokines and cytokines before neutrophils and macrophage recruitment in different regions of rat liver after TAA administration. *Lab Invest*. 2014 Feb;94(2):235–47.
33. Xu R, Huang H, Zhang Z, Wang F-S. The role of neutrophils in the development of liver diseases. *Cell Mol Immunol*. 2014 May;11(3):224–31.
34. Day RB, Link DC. Regulation of neutrophil trafficking from the bone marrow. *Cell Mol Life Sci*. 2012 May;69(9):1415–23.
35. Rajarathnam K, Prado GN, Fernando H, Clark-Lewis I, Navarro J. Probing receptor binding activity of interleukin-8 dimer using a disulfide trap. *Biochemistry*. 2006 Jun 27;45(25):7882–8.
36. Skinner DD, Lane TE. CXCR2 Signaling and Remyelination in Preclinical Models of Demyelination. *DNA and Cell Biology*. 2020 Jan 1;39(1):3–7.
37. Wu F, Zhao Y, Jiao T, Shi D, Zhu X, Zhang M, et al. CXCR2 is essential for cerebral endothelial activation and leukocyte recruitment during neuroinflammation. *J Neuroinflammation*. 2015 May 21;12:98.
38. Raghuwanshi SK, Su Y, Singh V, Haynes K, Richmond A, Richardson RM. The chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 couple to distinct G protein-coupled receptor kinases to mediate and regulate leukocyte functions. *J Immunol*. 2012 Sep 15;189(6):2824–32.
39. Nasser MW, Raghuwanshi SK, Grant DJ, Jala VR, Rajarathnam K, Richardson RM. Differential activation and regulation of CXCR1 and CXCR2 by CXCL8 monomer and dimer. *J Immunol*. 2009 Sep 1;183(5):3425–32.
40. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Nov;1843(11):2563–82.
41. Hosking MP, Lane TE. The role of chemokines during viral infection of the CNS. *PLoS Pathog*. 2010 Jul 29;6(7):e1000937.

42. Jaeschke H. Inflammation in response to hepatocellular apoptosis. *Hepatology*. 2002 Apr;35(4):964–6.
43. Simmons SB, Liggitt D, Goverman JM. Cytokine-regulated neutrophil recruitment is required for brain but not spinal cord inflammation during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2014 Jul 15;193(2):555–63.
44. Massena S, Christoffersson G, Hjertström E, Zcharia E, Vlodavsky I, Ausmees N, et al. A chemotactic gradient sequestered on endothelial heparan sulfate induces directional intraluminal crawling of neutrophils. *Blood*. 2010 Sep 16;116(11):1924–31.
45. Yang J, Liu H, Cao Q, Zhong W. Characteristics of CXCL2 expression in coronary atherosclerosis and negative regulation by microRNA-421. *J Int Med Res*. 2020;48(2):300060519896150.
46. Muñoz A, Costa M. Nutritionally mediated oxidative stress and inflammation. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:610950.
47. Kobayashi Y. Neutrophil infiltration and chemokines. *Crit Rev Immunol*. 2006;26(4):307–16.
48. Tourniaire F, Romier-Crouzet B, Lee JH, Marcotorchino J, Gouranton E, Salles J, et al. Chemokine Expression in Inflamed Adipose Tissue Is Mainly Mediated by NF-κB. Xu H, editor. *PLoS ONE*. 2013 Jun 18;8(6):e66515.
49. Marrack P, Kappler J, Kotzin BL. Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nat Med*. 2001 Aug;7(8):899–905.
50. Knip M, Siljander H. Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes. *Autoimmun Rev*. 2008 Jul;7(7):550–7.
51. Tuller T, Atar S, Ruppin E, Gurevich M, Achiron A. Common and specific signatures of gene expression and protein-protein interactions in autoimmune diseases. *Genes Immun*. 2013 Mar;14(2):67–82.
52. Sadik CD, Kim ND, Luster AD. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol*. 2011 Oct;32(10):452–60.
53. Diana J, Simoni Y, Furio L, Beaudoin L, Agerberth B, Barrat F, et al. Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes. *Nat Med*. 2013 Jan;19(1):65–73.
54. Lehuen A, Diana J, Zaccane P, Cooke A. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nat Rev Immunol*. 2010 Jul;10(7):501–13.
55. Padgett LE, Broniowska KA, Hansen PA, Corbett JA, Tse HM. The role of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines in type 1 diabetes pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 2013 Apr;1281:16–35.
56. Coppieters KT, Dotta F, Amirian N, Campbell PD, Kay TWH, Atkinson MA, et al. Demonstration of islet-autoreactive CD8 T cells in insulitic lesions from recent onset and long-term type 1 diabetes patients. *J Exp Med*. 2012 Jan 16;209(1):51–60.

57. Coppieters KT, von Herrath MG. Histopathology of type 1 diabetes: old paradigms and new insights. *Rev Diabet Stud.* 2009;6(2):85–96.
58. Ehses JA, Perren A, Eppler E, Ribaux P, Pospisilik JA, Maor-Cahn R, et al. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2007 Sep;56(9):2356–70.
59. Eguchi K, Manabe I, Oishi-Tanaka Y, Ohsugi M, Kono N, Ogata F, et al. Saturated fatty acid and TLR signaling link β cell dysfunction and islet inflammation. *Cell Metab.* 2012 Apr 4;15(4):518–33.
60. Baggiolini M. Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med.* 2001 Aug;250(2):91–104.
61. Colditz IG, Schneider MA, Pruenster M, Rot A. Chemokines at large: in-vivo mechanisms of their transport, presentation and clearance. *Thromb Haemost.* 2007 May;97(5):688–93.
62. Bens M, Vimont S, Ben Mkaddem S, Chassin C, Goujon J-M, Balloy V, et al. Flagellin/TLR5 signalling activates renal collecting duct cells and facilitates invasion and cellular translocation of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.* 2014 Oct;16(10):1503–17.
63. Marro BS, Grist JJ, Lane TE. Inducible Expression of CXCL1 within the Central Nervous System Amplifies Viral-Induced Demyelination. *J Immunol.* 2016 Feb 15;196(4):1855–64.
64. Kruger P, Saffarzadeh M, Weber ANR, Rieber N, Radsak M, von Bernuth H, et al. Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathog.* 2015 Mar;11(3):e1004651.
65. Deftu AT, Ciorescu R, Gheorghe R-O, Mihăilescu D, Ristoiu V. CXCL1 and CXCL2 Inhibit the Axon Outgrowth in a Time- and Cell-Type-Dependent Manner in Adult Rat Dorsal Root Ganglia Neurons. *Neurochem Res.* 2019 Sep;44(9):2215–29.
66. Brown AJ, Joseph PRB, Sawant KV, Rajarathnam K. Chemokine CXCL7 Heterodimers: Structural Insights, CXCR2 Receptor Function, and Glycosaminoglycan Interactions. *Int J Mol Sci.* 2017 Apr 1;18(4).
67. Joseph PRB, Mosier PD, Desai UR, Rajarathnam K. Solution NMR characterization of chemokine CXCL8/IL-8 monomer and dimer binding to glycosaminoglycans: structural plasticity mediates differential binding interactions. *Biochem J.* 2015 Nov 15;472(1):121–33.
68. Wolpe SD, Sherry B, Juers D, Davatelis G, Yurt RW, Cerami A. Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989 Jan;86(2):612–6.
69. Liu Y-W, Li S, Dai S-S. Neutrophils in traumatic brain injury (TBI): friend or foe? *J Neuroinflammation.* 2018 May 17;15(1):146.

70. Lentini G, Famà A, Biondo C, Mohammadi N, Galbo R, Mancuso G, et al. Neutrophils Enhance Their Own Influx to Sites of Bacterial Infection via Endosomal TLR-Dependent Cxcl2 Production. *Jl*. 2020 Feb 1;204(3):660–70.
71. Das ST, Rajagopalan L, Guerrero-Plata A, Sai J, Richmond A, Garofalo RP, et al. Monomeric and dimeric CXCL8 are both essential for in vivo neutrophil recruitment. *PLoS ONE*. 2010 Jul 26;5(7):e11754.
72. Craciun FL, Schuller ER, Remick DG. Early enhanced local neutrophil recruitment in peritonitis-induced sepsis improves bacterial clearance and survival. *J Immunol*. 2010 Dec 1;185(11):6930–8.
73. Luscinckas FW. CXCL1 excess stops neutrophils in their tracks. *Blood*. 2013 Nov 28;122(23):3708–10.
74. Robertson JM, Walsh-Weller J. An introduction to PCR primer design and optimization of amplification reactions. *Methods Mol Biol*. 1998;98:121–54.
75. Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MA. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988 Dec;85(24):9436–40.
76. Siebert PD, Larrick JW. Competitive PCR. *Nature*. 1992 Oct 8;359(6395):557–8.
77. Álvarez-Fernández R. Explanatory chapter: PCR primer design. *Meth Enzymol*. 2013;529:1–21.
78. Sharrocks AD, Shaw PE. Improved primer design for PCR-based, site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res*. 1992 Mar 11;20(5):1147.
79. BELAID N. Elaboration d’amorces pour le gène de la Glutathion peroxydas 3 GPx3 [Internet]. [TLEMEN]: UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMEN; 2017. Available from: <http://dspace.univ-tlemcen.dz/bitstream/112/12000/1/Belaid-nadia.pdf>
80. Lorenz TC. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *JoVE*. 2012 May 22;(63):3998.