



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 Biologie

Laboratoire de biologie moléculaire et immunologie



MEMOIRE

Présenté par

Maharrar Fatma

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Immunologie

Intitule :

NOTCH et la dichotomie de TH1 TH2 dans L auto-immunité

Sous la direction de Professeur :SMAHI C M I

Soutenu le 20/10/2020 , devant le jury composé de :

Dr. EL-MAZOUR C

Présidente

Université de Tlemcen

Pr. SMAHI C M I

Encadreur

Université de Tlemcen

Dr. BENMANSOUR S A

Examineur

Université de Tlemcen

Année universitaire 2019/2020

Dédicace

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

Je remercie beaucoup tout d'abord « Dieu » pour mon succès au cours de ma carrière universitaire et pour m'avoir donné le courage d'entamer et de finir ce travail....

Je dédie ce mémoire comme preuve de respect de gratitude et de reconnaissance à mes chers parents qui m'ont soutenu par leurs prières et leurs soutiens morale et m'ont suivi tout au long mes études que dieu les protège

À mes deux frères et ma belle sœur chaima

Et mes collègues d'études de la promotion d'immunologie sans exception ...

À mes amies :Chahrazed, Kenza, Hayat, Bochra , Nour el houda et Karima

Ensuite, j'adresse mes remerciements particuliers à mes professeurs d'immunologie ...

Et à tous ceux qui m'ont soutenu ...

TABLES DES MATIERS

Introduction

Chapitre01 :Revue de la littérature

1.L'auto-immunité

- 1.1.Généralité
- 1.2. La tolérance du soi
 - 1.2.1.Tolerance central
 - 1.2.2. Tolérance périphérique
- 1.3.Rupture de tolérance
- 1.4.Facteurs déclencheurs de l'auto-immunité
 - 1.4.1. Facteurs génétiques
 - 1.4.2. Facteurs génétiques
 - 1.4.3. Le stress
 - 1.4.4. Des médicaments
- 1.5.Mécanisme de l' auto-immunité
- 1.6.Mécanisme de l'auto-immunité au cours de déficit immunitaire
- 1.7.Mécanisme des lésionnels des maladies auto-immunes
 - 1.7.1. Rôle pathogène des auto-anticorps
 - 1.7.2.Rôle pathogène des lymphocytes T
- 1.8. Diagnostic des maladies auto-immunes

2.Lymphocyte T Helper (TH1/TH2)

- 2.1.TH1
- 2.2. TH2

3.Le gène NOTCH

- 3.1. Définition
- 3.2. La protéine Notch
- 3.3. La signalisation de Notch
- 3.4.Notch et la dichotomie de TH1 et TH2 dans l'auto-immunité

4.PCR (Polymérase Chaîne Réaction)

- 4.1.Définition
- 4.2.Principe
- 4.3.Les étapes PCR
- 4.5.Les acteurs de PCR
 - 4.4.1.L'ADN
 - 4.5.2.Les amorces, sens et anti sens
 - 4.5.3.Taq polymérase

4.5.4. Les nucléotides

Chapitre02 :Matériels et méthodes

1. Conception des amorces
 - 1.1. Sélection d'amorce
2. Recherche de la séquence de référence du gène NOTCH
3. Le design des Primer
4. Analyse des Résultats du Primer Blast

Chapitre03 :Résultats et prescriptives

- 1 .Résultats de la conception des amorces
 1. Interprétation des résultats
 2. Conformation de résultats

Chapitre04 :Conclusion

Références bibliographique

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1.1 :Principaux mécanismes physiopathologiques à l'origine d'auto-immunité dans le déficits immunitaires primitifs.

Figure 1.2 :schéma représente la différenciation de LT4 naïf en TH1 et TH2

Figure 1.3 :localisation du gène Notch1

Figure 1.4 :localisation du gène Notch2

Figure 1.5 :Récepteurs et ligands NOTCH.

Figure 1.6 :la signalisation Notch dans la différenciation des cellules T helper (Th)

Figure 2.1 : Séquence du gène codant Notch1 sur le site ensembl.org.

Figure 2.2 : Séquence de gène Notch1 d'intérêt copié dans le document word .

Figure 2.3 : L'outil Primer blast.

Figure 2.4 :La séquence du gène Notch1 copié sur le logiciel Primer blast.

Figure 3.1 : Résultats de conception des amorces par le Primer Blast du gène Notch1

Figure 3.2 : site de confirmation des amorces In-Silico PCR.

Figure 3.3: Confirmation des résultats 1.

Tableau 1 : Classification des maladies auto-immunes

LISTE DES ABREVEATIONS

AI : Auto-immunité

Auto-AG : Auto-Antigène

anti-ADN :anti- Acide désoxyribonucléique

anti- ARN :anti- Acide ribonucléique

BCR :Récepteur de lymphocyte B

CPA : cellules présentatrices d'Ag

CD : Cluster de différenciation

dNTPs : (désoxy Nucléotides Triphosphates)

EGF : facteur de croissance épidermique DC : Cellule dendritique

GATA3 : Trans-acting T cell specific transcription factor 3

HD : Domaine d'hétérdimérisation

HLA : Antigènes des leucocytes humains

IFN- γ : Interféron- γ

IL- :Interleukine-(4 ,5 ,6,10,13)

IgM : immunoglobuline M

IC :Intracellulaire C-terminale

LED : lupus érythémateux disséminé

LT : Lymphocyte T

LB :Lymphocyte B

LNR : Répétitions Lin12 / Notch

MAI : Maladie auto-immunes

MC : maladie de Crohn

NRR : région de régulation négative juxtamembranaire

NK :Nature killer

PEST : région C-terminale riche en proline, glutamate, sérine et thréonine

PCR : Polymérase chaîne réaction

RC :Région extracellulaire N-terminale

SEP : Sclérose en plaque

Syndrome APECED :Poly Endocrinopathie Auto-immune associée à une Candidose

syndrome IPEX :Immune Régulation Polyendocrinopathy-Enteropathy X-linked

TSH :Hormone Sécrétée par l'Hypophyse

STAT6 : Signal Transducer and Activator of Transcription 6

TNF :Tumor Necrosis Factor

TCD4+ : Lymphocyte T CD4+

TM :Domaine transmembranaire

TAD :Domaine d'activation transcriptionnel

TCR : Récepteur de lymphocyte T

Résumé :

Une maladie auto-immune est une pathologie au cours de laquelle le système immunitaire attaque ses propres constituants. Elle est caractérisée par la polarisation et différenciation des lymphocytes helper TH1 et TH2 auto-réactifs. Le gène NOTCH favorise la dichotomie de th1 et th2, l'expression de ce récepteur fait l'objet de plusieurs études, dont l'utilisation des méthodes de la biologie moléculaire tels que la technique de la PCR est considérée comme un étape essentielle pour réaliser ces études, le choix des bonnes paires d'amorces pour la réaction (PCR) par la conception des amorces est une étape obligatoire afin d'effectuer l'étude.

Objectif : Concevoir la bonne paire d'amorces à l'aide de la PCR et des logiciels de la bio-informatique tels que le Primer Blast.

But: Choisir la bonne paire d'amorces conçues par le Primer Blast qui assurent une bonne amplification de la PCR. Ceci permettra comme perspective d'étudier les associations entre le récepteur NOTCH et la dichotomie de TH1 et TH2 dans l'auto-immunité.

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 NOTCH visées par le PCR et données par le Primer blast.

Mots clés : NOTCH , th1 ,th2 ,l'auto-immunité, PCR , conception d'amorce

Abstract :

An autoimmune disease is a condition in which the immune system attacks its own constituents. It is characterized by the polarization and differentiation of the self-reactive TH1 and TH2 helper lymphocytes. The NOTCH gene promotes the dichotomy of th1 and th2, the expression of this receptor is the subject of several studies, of which the use of molecular biology methods such as the PCR technique is considered an essential step to achieve. In these studies, choosing the right primer pairs for the reaction (PCR) by the primer design is a mandatory step in order to perform the study.

Objective: To design the correct pair of primers using PCR and bioinformatics software such as Primer Blast.

Goal: Choose the right pair of primers designed by the Primer Blast that ensure good PCR amplification. This will allow, as a perspective, to study the associations between the NOTCH receptor and the dichotomy of TH1 and TH2 in autoimmunity.

Materials and Methods: Design the correct primer by PCR and confirm it using biotechnology sites.

Results: Confirmation of the presence of the primers of the NOTCH gene targeted by the PCR and given by the Primer blast.

Keywords: NOTCH, th1, th2, autoimmunity, PCR, primer design

الملخص

مرض المناعة الذاتية هو حالة يهاجم فيها الجهاز المناعي مكوناته. يتميز بالاستقطاب والتمايز بين الخلايا الليمفاوية المساعدة TH1 و TH2 ذاتية التفاعل. يعمل جين NOTCH على تعزيز الانقسام بين th1 و th2 ، والتعبير عن هذا المستقبل هو موضوع العديد من الدراسات ، والتي يعتبر استخدام طرق البيولوجيا الجزيئية مثل تقنية PCR خطوة أساسية لتحقيق في هذه الدراسات ، واختيار الصحيح تعد أزواج التمهيدي للتفاعل (PCR) من خلال التصميم التمهيدي خطوة إلزامية لإجراء الدراسة.

الهدف: تصميم الزوج الصحيح من البادئات باستخدام برامج

PCR والمعلوماتية الحيوية مثل Primer Blast.

الهدف: اختر الزوج المناسب من البرايمر المصمم بواسطة Primer Blast والذي يضمن تضخيم PCR جيداً. سيسمح هذا ، كمنظور ، بدراسة الارتباطات بين مستقبلات NOTCH وثنائية TH1 و TH2 في المناعة الذاتية.

المواد والطرق: تصميم التمهيدي الصحيح بواسطة PCR وتأكيد باستخدام مواقع التكنولوجيا الحيوية.

النتائج: تأكيد وجود البادئات لجين NOTCH المستهدف بواسطة PCR والمعطى بواسطة انفجار Primer.

Introduction

Le système immunitaire assure la protection contre les agents pathogènes à travers des réponses innées et / ou adaptatives tout en assurant le maintien de l'intégrité de l'organisme par l'induction d'une tolérance vis-à-vis des composés du soi. Cette tolérance met en jeu différents mécanismes régulés et coordonnés. L'éducation des lymphocytes à ne pas reconnaître des composants du soi dans les organes lymphoïdes primaires ; la moelle osseuse et le thymus est maintenue en périphérie par des mécanismes hautement régulés. Dans le cas de rupture de tolérance souvent liée à une inflammation, des lymphocytes auto-réactifs sont activés par la reconnaissance de composés du soi comme des antigènes, ce qui peut conduire à des pathologies auto-immunes.

Les maladies auto-immunes touchent 5 à 8 % de la population. Elles comprennent 70 à 80 pathologies différentes, comme la polyarthrite lupus érythémateux disséminé, la sclérose en plaque, le diabète de type 1, le psoriasis.... (Dragin et al., 2017).

La rupture de tolérance est l'origine de l'auto réactivité des cellules immunitaire tel que les lymphocytes TCD4+, TCD8+, lymphocyte B LB ...ect. Les cellules TCD+ sont activées et différencie en lymphocyte helper de type 1 TH1 et de type 2 TH2 auto réactifs suite a une activation par l'antigènes présente par la cellule dendritique (DC), environnement cytokinique, facteurs de transcription ainsi le récepteur Notch liés à la membrane jouent un rôle important dans l'orchestration de la différenciation des cellules Th. les DC qui expriment les ligands de type delta ou Jagged Notch acquièrent la capacité d'instruire la polarisation des cellules Th1 ou Th2, respectivement. (Tindemans et al., 2017a)

La signalisation Notch est une voie de transduction du signal conservée dans l'évolution, qui contrôle divers aspects du développement et de l'homéostasie tissulaire. Chez les mammifères, il existe quatre récepteurs Notch différents (Notch 1–4) et cinq ligands Notch (Jagged 1 et 2, Delta-like 1, 3 et 4). (Sauma et al., 2011).

Chaque protéine Notch est codée par un gène différent. (Arruga et al., 2018). Le gène Notch1 est localisé sur le chromosome 9(9q34.3). Le gène Notch2 : est exprimé sur le chromosome 1p12 et code pour la protéine encoche 2. Les gènes Notch3 et 4 : sont localisés sur le chromosome 19p13-14 et 6p21-32 respectivement chez l'homme. L'étude de l'expression de ce gène par les techniques de la biologie moléculaire permet de fournir de nouvelles méthodes pour diagnostiquer, évaluer, contrôler et traiter les maladies auto-immunes.

La PCR est un test enzymatique qui permet l'amplification de gène en utilisant des amorces Oligo- nucléotidiques conçues par un logiciel de la conception des amorces.

Dans notre étude nous essayons de concevoir la bonne paire d'amorces pour le gène Notch à l'aide de la PCR et des logiciels de bio-informatique Primer Blast. Afin de choisir la bonne paire d'amorces conçues par le Primer Blast qui assurent une bonne amplification de la PCR. Ceci permettra comme perspective d'étudier les associations entre le récepteur Notch et la dichotomie de TH1 et TH2 dans l'auto-immunité.

REVUE LITTÉRATURE

1. L'auto-immunité

1.1. Généralité

Le système immunitaire est capable, en discriminant le soi du non soi, de détruire de nombreux agents pathogènes, mais leur réactions peuvent se révéler délétères dans des phénomènes comme l'attaque de ses propres constituants que l'on appelle auto-immunité(AI).

L'auto-immunité est la rupture des mécanismes de défense qui conduit à l'action pathogène du système immunitaire vis-à-vis des constituants naturels de l'organisme et à l'apparition d'une maladie dite auto-immune (MAI). Cette dernière peut être définie par l'activation du système immunitaire du patient contre ses propres antigènes (Ag). (Bonnotte et al, 2004).

Les MAI touchent 5 à 8 % de la population. Elles comprennent 70 à 80 pathologies différentes, comme la polyarthrite, le lupus érythémateux disséminé, la sclérose en plaque, le diabète de type 1, le psoriasis, la maladie de Crohn et la myasthénie grave .(Dragin et al., 2017)

Le lupus érythémateux disséminé (LED) affecte environ 20 000 personnes en France (chiffres de 2010) et plus de 5 millions de patients dans le monde. D'autres MAI sont encore plus fréquentes, comme la polyarthrite rhumatoïde (600 000 personnes touchées en France), le diabète de type I (300 000 en France), la maladie de Crohn (ou MC, 200 000 en France en 2011) ou la sclérose en plaques (ou SEP, 70 à 90 000 en France). (Muller, 2017)

Une MAI est une pathologie au cours de laquelle le système immunitaire agresse ses propres constituants en les considérant comme étrangères. Cela va créer une réaction inflammatoire.

Elles peuvent être schématiquement divisées en deux groupes principaux (voir Tableau 1):

- les maladies auto-immunes spécifiques d'organes caractérisées par des lésions limitées à un tissu (comme le diabète de type 1 qui est la conséquence d'une destruction des cellules beta du pancréas).
- des maladies auto-immunes systémiques, caractérisées par des lésions bien plus étendues (le lupus, les sclérodermies et les poly myosites...,ect) .(Muller, 2017)

Maladies auto-immunes spécifiques d'organes	Maladies auto-immunes non spécifiques systémiques
<ul style="list-style-type: none"> • Diabète de type 1 • Thyroïdite auto-immune • Hépatopathies auto-immunes • Myasthénie • Vitiligo • Maladie d'Addison • Rétinite auto-immune • Cytopénies auto-immunes 	<ul style="list-style-type: none"> • Syndrome de Gougerot-Sjogren • Polyarthrite rhumatoïde • Sclérodermie • Poly-myosite et dermato polymyosite. • Connectivite mixte • Vascularité primitive • Poly chondriteatrophiante

Tableau 1 : classification des maladies auto-immunes

Le caractère pathologique de la réaction immunitaire au cours des MAI tient à sa cible (auto-Ag) et à son caractère chronique. La mise en place d'une réponse dirigée contre le soi implique la survenue d'une rupture de tolérance. La persistance de la réponse immunitaire ainsi que les dommages tissulaires sont la conséquence de l'activation lymphocytaire T et B.

De nombreux facteurs peuvent s'intriquer et induire une rupture de la tolérance du soi à l'origine des maladies auto-immunes .(Delévaux et al., 2013)

1.2 . La tolérance du soi

La fonction du système immunitaire est d'assurer l'intégrité de l'organisme: pour cela, il reconnaît une variété considérable de pathogènes (microbes, parasites, virus...) sans pour autant réagir aux antigènes de l'individu (le soi). Cette absence de réponse aux antigènes du soi est appelée « tolérance immunitaire ». Elle résulte d'une « éducation » des lymphocytes B (LB) et lymphocyte T (LT) au cours de leur maturation, respectivement dans la moelle osseuse et le thymus. Plusieurs mécanismes participent à l'établissement de cette tolérance : centrale (dans le thymus ou la moelle osseuse) ou périphérique (ganglions, tissus).

1.2.1.Tolérance centrale

La tolérance centrale s'appuie sur la délétion clonale et la réédition du BCR. La délétion clonale aboutit à la mort cellulaire des LT et LB ayant un TCR ou un BCR non fonctionnel (sélection positive) ou reconnaissant les auto-Ag avec une trop forte affinité (sélection négative). La réédition du récepteur ou « receptor editing » est un phénomène propre au BCR.

Pour les lymphocytes T (dans le thymus) :

- sélection positive des TCR capables de reconnaître le HLA de classe I ou II de l'individu
- sélection négative des TCR auto réactifs.

Pour les lymphocytes B (dans la moelle osseuse) :

- sélection négative des BCR reconnaissant les autoantigènes avec une forte affinité
- « receptor editing » : recombinaisons au niveau des gènes des BCR, pour en modifier la spécificité

1.2.2. Tolérance périphérique

En périphérie, l'anergie assure la tolérance en permettant un état de non-réponse spécifique. Un LT est rendu anergique par une stimulation antigénique non accompagnée

des signaux de co-stimulation délivrés par certaines molécules membranaires des cellules présentatrices d'Ag (CPA) (CD80, CD86).

Au cours de l'anergie des LB exprime de faible niveau d'IgM à leur surface. Ils sont caractérisés par l'absence de marqueurs d'activation, une diminution des molécules de co-stimulation (CD19 et CD21), une capacité de prolifération, de différenciation et de production d'Ig diminuée. Les populations régulatrices (T régulatrices, B régulatrices notamment) sont également impliquées dans la tolérance

1.3.Rupture de tolérance

La rupture de tolérance est une étape clé dans la physiopathologie des MAI. Parmi les acteurs cellulaires et moléculaires majeurs impliqués dans ce phénomène.

- Syndrome APECED (poly endocrinopathie auto-immune associée à une candidose) : est la conséquence d'un déficit génétique de AIRE, facteur de transcription permettant aux cellulaires médullaires thymiques d'exprimer un grand nombre d'auto-Ag tissulaires conduisant à l'éducation centrale des LT et à la délétion des clones auto-réactifs. Ce déficit conduit ainsi à la génération de LT auto-réactifs par défaut de tolérance centrale.
- Le syndrome IPEX (immune régulation polyendocrinopathy-enteropathy X-linked) est un autre exemple de MAI monogénique. Il s'agit d'une atteinte auto-immune (endocrinienne et intestinale) T dépendante.
- Défaut génétique concerne Foxp-3 qui est le facteur de transcription spécifique des LT régulateurs CD4+ CD25+ .(Davidson and Diamond, 2001)

Ces situations exceptionnelles démontrant l'importance des mécanismes de tolérance et comment un défaut de l'un de ces mécanismes peut aboutir à lui seul (mono génique) à l'auto-immunité. Les mécanismes aboutissant à la rupture de tolérance sont multiples et le plus souvent très partiellement identifiés. Les pistes évoquées concernent à la fois l'Ag (réactivité croisée par mimétisme moléculaire, modification d'auto-Ag par un Ag exogène et

effet des agents infectieux, épitopes et des défauts des mécanismes de tolérance (défaut des populations régulatrices, expression anormale d'une molécule de co-stimulation).

1.4.Facteurs déclencheurs de l'auto-immunité

L'origine des MAI est multifactoriel .Différents facteurs endogènes, génétiques, environnementaux et hormonaux peuvent contribuer à l'émergence d'une MAI.

1.4.2. Facteurs génétiques :

Les études génétiques réalisées dans les modèles animaux de MAI ont montré qu'il existait au moins 25 gènes (Peter,2003) qui peuvent contribuer à une susceptibilité particulière pour ces maladies . Ces gènes codent principalement pour les protéines du CMH de classe I et de classe II (B27, DR2 ,DR3, DR4, DR5, B8...etc), les cytokines, les récepteurs des cytokines, les protéines impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire et dans l'apoptose (André et al,2007) .

1.4.1.Facteurs environnementaux :

Plusieurs facteurs externes favorisent le développement des maladies auto-immunes comme les rayons ultra-violets, Les infections virales ou bactériennes peuvent contribuer par mimétisme moléculaire, extension de la réponse immunitaire (epitope spreading) et activation des cellules auto réactives à la perte de la tolérance du soi .(Delévaux et al., 2013)

1.4.2. Le stress :

Les conséquences biologiques du stress sont de mieux en mieux comprises. Au cours du stress, les glucocorticoïdes et les catécholamines libérées par l'axe hypothalamo-hypophysaire vont modifier l'équilibre des balances cytokiniques Th1/Th2 et Th17/Treg et être à l'origine d'une inhibition de l'immunité cellulaire, d'une diminution de la tolérance immunitaire et d'une stimulation de l'immunité humorale (Chamoux et al, 2013)

1.4.3. Des médicaments :

Un certain nombre de médicaments et d'agents chimiques sont incriminés dans le déclenchement des maladies auto-immunes et en particulier dans le Lupus érythémateux disséminé LED comme le procainamide (un anti-arythmique) .

L'administration de vaccins, par leur contenant immunogène ou leurs adjuvants, a été associée à l'apparition de MAI. Un tabagisme est plus fréquemment retrouvé chez les patients porteurs d'une sclérose en plaque .(Delévaux et al., 2013)

1.5.Mécanismes de l' auto-immunité

Les principaux mécanismes qui pourraient être impliqués dans la production d'auto anticorps sont résumés :

- Mimétisme moléculaire : signifie que certains antigènes microbiens peuvent partager des motifs communs avec des antigènes du soi et être à l'origine de l'activation de cellules auto-réactives. Ainsi, à l'occasion d'une infection par une bactérie, un virus ou un parasite qui exprime des antigènes apparentés avec les antigènes du patient, des lymphocytes T reconnaissant un épitope étranger pourront coopérer avec des lymphocytes B dirigés contre l'épitope commun au soi et à l'antigène exogène, permettant ainsi, aux LB de produire de grandes quantités d'anticorps (AC). Donc l'organisme va déclencher une réponse immunitaire qui va détruire à la fois cet agent infectieux mais aussi ses propres cellules.

- L'expression anormale des molécules HLA de classe II à la surface de cellules, qui, naturellement, n'en expriment pas, peut permettre à des lymphocytes T ayant échappés à la délétion et à l'anergie de reconnaître un auto-antigène. Des infections, en particulier virales, peuvent induire une telle expression. Cela n'est pas suffisant expérimentalement pour induire une maladie auto-immune, mais dans la mesure où l'auto-immunisation est multifactorielle, ce mécanisme peut être un des éléments impliqués. Un défaut de contrôle par des cellules T

suppressives peut aussi contribuer à l'auto-immunisation, comme le montrent certains modèles animaux et comme le suggèrent les déficits en fonctions T suppressives constatés dans certains nombres de maladies auto-immunes (Achour et al, 2014).

1.6. Mécanismes de l'auto-immunité au cours de déficit immunitaire

Déficit immunitaire et auto-immunité sont deux manifestations d'un dysfonctionnement du système immunitaire qui peuvent être associés, avec des liens physiopathologiques communs. Les mécanismes impliqués dans cette rupture de tolérance au cours des déficits immunitaires sont résumés sur la Figure 1.1

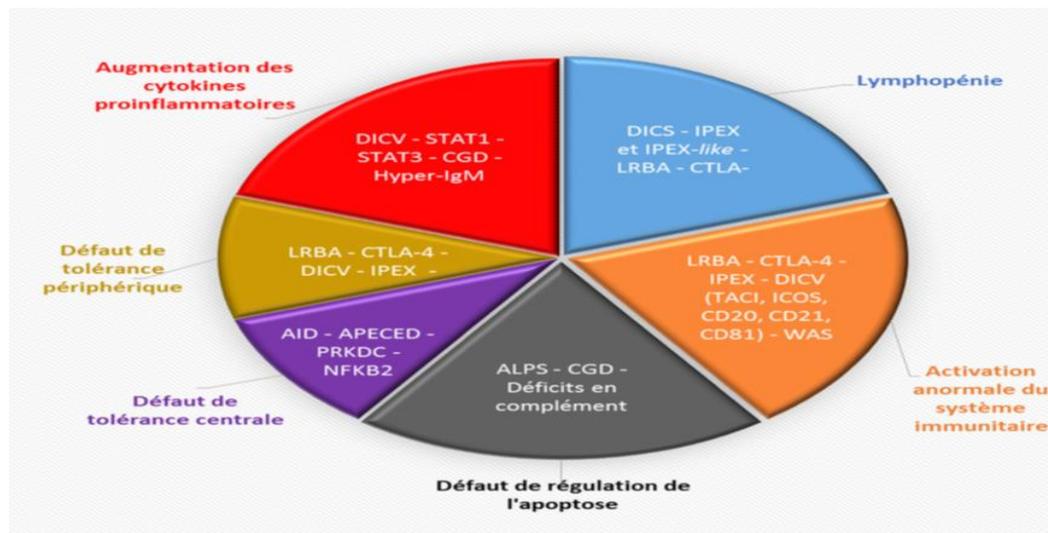


Figure 1.1 : Principaux mécanismes physiopathologiques à l'origine d'auto-immunité dans les déficits immunitaires primitifs.

1.7. Mécanisme des lésionnels des maladies auto immunes :

1.7.1. Rôle pathogène des auto-anticorps

L'effet pathogène des auto-anticorps se fait via différents mécanismes :

- Anticorps « cytolytiques » : la fixation des auto-anticorps sur les cellules de l'individu conduit à l'activation du complément, puis à la lyse de ces cellules. C'est le cas des anémies hémolytiques aiguës.

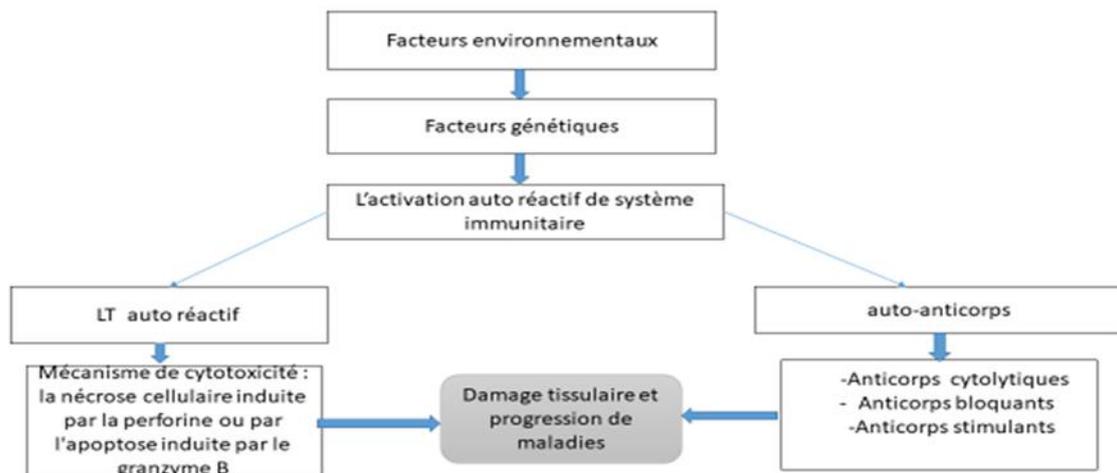
- Anticorps bloquants : c'est l'anomalie fondamentale à l'origine de la myasthénie auto-immune. Dans la majorité des cas, ce trouble est dû à la fixation d'auto-anticorps dirigés contre des récepteurs servant à transmettre l'influx nerveux (récepteurs de l'acétylcholine) : la fixation de l'anticorps sur le récepteur empêche la fixation de l'acétylcholine, sur ce dernier, rendant ainsi le récepteur inactif.
- Anticorps stimulants : ils agissent en sens inverse des anticorps bloquants. Dans la maladie de Basedow (maladie auto-immune de la thyroïde), les anticorps anti-récepteur de la TSH se fixent à ce récepteur et miment les effets de son ligand, la TSH (hormone sécrétée par l'hypophyse et dont le rôle est de stimuler et de régir la sécrétion d'hormones thyroïdiennes). Ils provoquent une hypersécrétion d'hormones thyroïdiennes. L'activité stimulante s'exerce aussi sur la croissance cellulaire, conduisant à la constitution d'un goitre

L'activation du complément par les complexes immuns déposés aboutit à la libération de médiateurs par les neutrophiles, qui libèrent à leur tour leur contenu, et génèrent des lésions.

1.7.2.Rôle pathogène des lymphocytes T

Les LT auto réactifs peuvent induire des lésions cellulaires par différents mécanismes de cytotoxicité .La cytolysse des cellules T des cellules cibles peut être médiée par la nécrose cellulaire induite par la perforine ou par l'apoptose induite par le granzyme B. Il a été suggéré que les cellules T auxiliaires de type 1 (TH1) sont essentielles pour l'induction de maladies auto-immunes par le recrutement de cellules inflammatoires et de médiateurs, tandis que les lymphocytes T auxiliaires de type 2 (TH2) protègent contre la maladie. Cependant, il est maintenant clair que via les cytokines produites par TH1,TH2 peut provoquer des lésions tissulaires .(Davidson and Diamond, 2001)

5. Mécanismes lésionnels des maladies auto-immunes



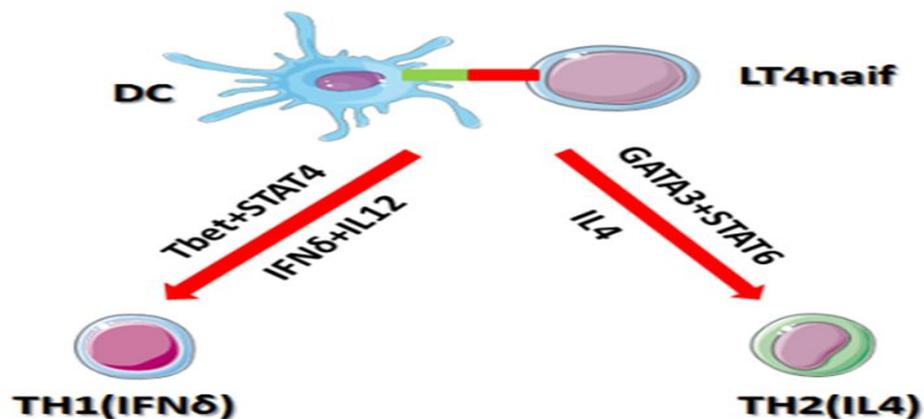
1.8. Diagnostic des maladies auto-immunes

On distingue schématiquement cinq catégories d'auto-anticorps utiles pour le diagnostic des maladies auto-immunes :

- les anticorps antinucléaires : anti-ADN, anti-nucléosome, anti-histone, anti-ARN, sont des marqueurs des maladies auto-immunes systémiques comme le lupus.
- les anticorps anti-tissus ou anti-cellules : ce sont des marqueurs des maladies autoimmunes spécifiques d'organe.
- les anticorps anti-IgG : par définition, il s'agit des facteurs rhumatoïdes.
- les anticorps anti phospholipides : ce sont des anticorps dirigés contre les phospholipides entrant dans la constitution de la membrane des cellules de notre organisme.
- les anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires : ils sont dirigés contre différentes enzymes cytoplasmiques des neutrophiles.

2.Lymphocyte T Helper CD4+(TH1/TH2)

Pour la protection contre les agents pathogènes, il est essentiel que les cellules T CD4 + naïfs se différencient en sous-ensembles de cellules T auxiliaires (Th) effectrices spécifiques notamment lymphocyte T Helper de type 1(TH1) et lymphocyte T Helper de type 2 (TH2) après l'activation par l'antigène présenté par les cellules dendritiques (CD) et un environnement cytokinique et l'implication des facteurs de transcription différents (Figure 1.2).



Selon

Figure 1.2 : schéma représentant la différenciation de LT4 naïf en TH1 et TH2

..

2.1.TH1

Dans un environnement cytokinique riche en IL-12 les LT4 naïf se différencient en lymphocytes Th1. Ils expriment les facteurs de transcriptions Tbet et STAT4 à l'origine de la sécrétion d'Interleukine IL-2, de l'interféron gamma (IFN) et du tumor necrosis factor (TNF) qui ont une activité pro-inflammatoire et stimulent l'immunité cellulaire : les cellules Nature Killer(NK) et les cellules T cytotoxiques (LTC). Ces cytokines stimulent la phagocytose et sont dirigées contre des pathogènes intracellulaires (virus, antigènes de tumeurs, etc).

2.2. TH2

Les TH2 sont caractérisées par l'expression du facteurs de transcription GATA3, STAT6 et de la production de cytokines telles que l'IL-4, l'IL-5 ,IL-10 et l'IL-13, qui jouent un rôle dans

la protection contre les pathogènes extracellulaires (bactéries, toxines et parasites)} ; et dans les réponses immunitaires allergiques telles que l'asthme allergique, induisant la synthèse d'IgE (IL-4), et le recrutement des éosinophiles (IL-5) et provoquant une hyperréactivité des muscles lisses et une hyperplasie des cellules gobillaires (IL-13),promouvant ainsi l'immunité humorale en stimulant la croissance et l'activation des mastocytes, des éosinophiles et la différenciation des lymphocytes B pour la synthèse d'anticorps. Ils ont également une activité anti-inflammatoire en inhibant l'activation macrophagique.

Il existe une inhibition mutuelle entre les deux voies pour que la balance Th1/Th2 reste à l'équilibre et à l'homéostasie. Ainsi l'IL-12 qui est produite par les cellules présentatrices d'antigènes et les cellules dendritiques et la production d'INF- γ sont inhibées par l'activité Th2 et la réponse Th1 est inhibée par la production d'IL-4 et IL-10 issues de la réponse Th2. Le déséquilibre dans la balance Th1/Th2 constaté au cours de certaines pathologies est le mécanisme physiopathologique retenu comme point de départ de ces maladies. Un profil Th1 avec un excès de production d'IL-12, de TNF- α alors que la production d'IL-10 est déficiente, est observé au cours de Polyarthrite Rhumatoïde (PR) , du diabète de type I, de la sclérose en plaque (SEP)(Delévaux et al., 2013). On peut conclure que l'auto réactivité de TH1 et la sécrétion des cytokines pro inflammatoires (IFN gamma) vont augmenter les lésions tissulaires et la progression des maladies auto immunes et l'auto réactivité de TH2 joue un rôle protecteur.

3.Le gène Notch

3.1. Définition

Les mammifères et l'homme expriment quatre récepteurs NOTCH (NOTCH1, 2, 3 et 4), chacun codé par un gène différent. (Arruga et al., 2018)

- a) Le gène Notch1 : code pour le récepteur transmembranaire Notch1 ou encoche 1 localisé sur le chromosome 9(9q34.3)

Chromosome 9 - NC_000009.12

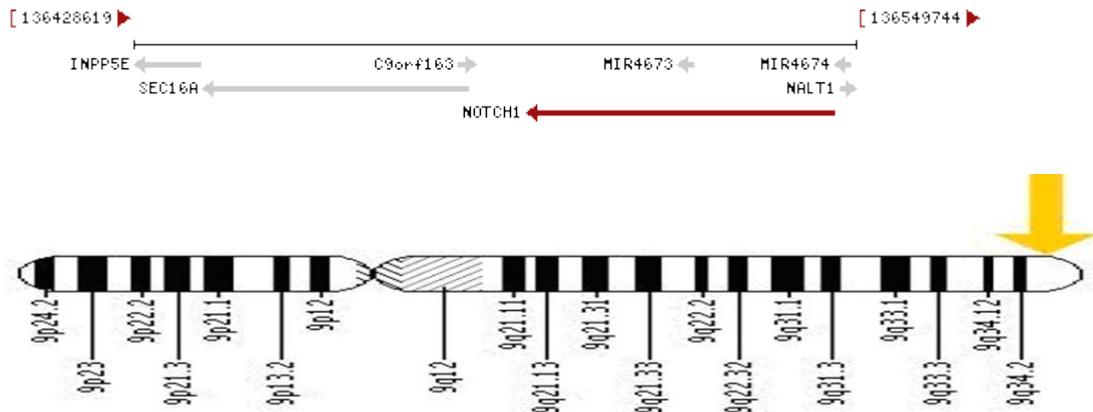


Figure 1.3 : localisation du gène Notch1

b) Le gène Notch2 : est exprimé sur le chromosome 1p12 et code pour la protéine encoche 2.

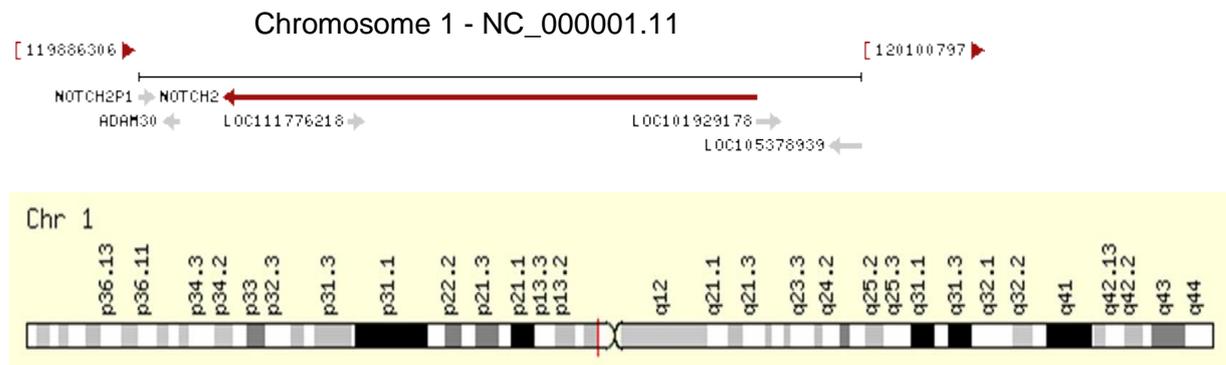


Figure 1.4 : localisation du gène Notch2

c) Les gènes Notch3 et 4 : sont localisés sur le chromosome 19p13 14 et 6p21 32 respectivement.

3.2. La protéine Notch

Les récepteurs NOTCH sont des protéines transmembranaires de type I présentant une homologie de structure élevée (en particulier NOTCH1 et NOTCH2) et affichant des fonctions à la fois communes et uniques. Ils sont synthétisés en tant que précurseurs uniques qui mûrissent dans l'appareil de Golgi lors du clivage protéolytique (S1) par une convertase de type furine. Les récepteurs matures exprimés à la surface cellulaire sont des hétéromères qui contiennent plusieurs répétitions du facteur de croissance épidermique extracellulaire (EGF) de 29 à 36. Des répétitions d'EGF spécifiques assurent la médiation

des interactions de ligand. Les répétitions EGF sont suivies par la région régulatrice négative (NRR), qui est composée de trois répétitions Lin riches en cystéine (LNR) et d'un domaine d'hétérodimérisation (HD). NOTCH contient également un domaine transmembranaire (TM), un domaine de module associé RBPJk (RAM), une séquence de localisation nucléaire (NLS), un domaine à sept répétitions d'ankyrine (ANK), une région de réponse cytokine (NCR) (NOTCH, un domaine de Trans activation (TAD)) et un domaine riche en proline-acide glutamique-sérine-thréonine (PEST). Les protéines NOTCH de mammifères sont clivées par des convertases de type furine, qui convertissent le polypeptide NOTCH en un domaine extracellulaire NOTCH (NECD) et un hétérodimère de domaine intracellulaire NOTCH (NICD) qui est connecté par des interactions non covalentes. Après la liaison du ligand, NOTCH est clivé par les métalloprotéases et la γ -sécrétase (S1, S2 et S3). (Arruga et al., 2018)

Les récepteurs Notch interagissent avec cinq ligands différents (DLL1, -3, -4 appartenant à la famille Delta-like et Jagged1 et-2 qui font partie du Serrate famille de ligands) (Hori et al., 2013)

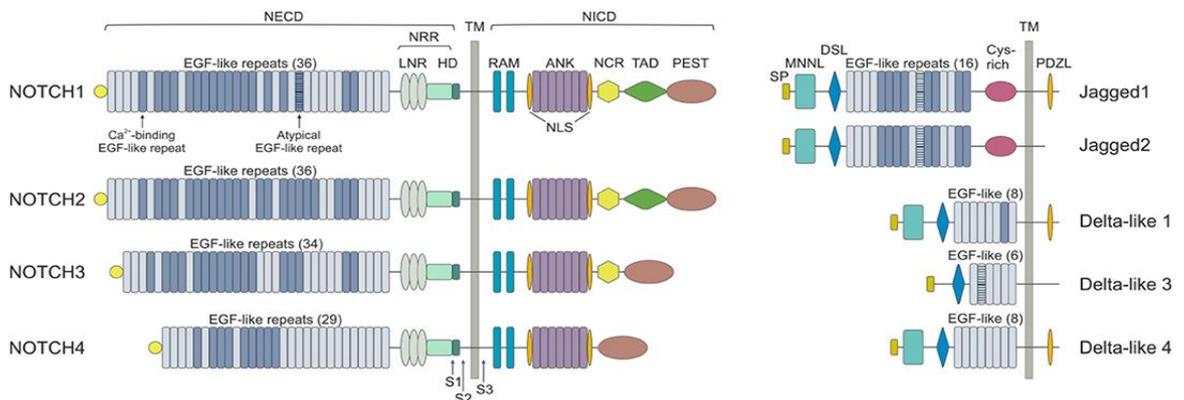


Figure 1.5 : Récepteurs et ligands NOTCH. (Arruga et al., 2018)

Région extracellulaire N-terminale (EC), Domaine transmembranaire (TM), Intracellulaire C-terminale (IC), facteur de croissance épidermique (EGF), région de régulation négative juxtamembranaire (NRR), Répétitions Lin2 / Notch (LNR), Domaine d'hétérodimérisation (HD), Domaine d'activation transcriptionnel (TAD), région C-terminale riche en proline, glutamate, sérine et thréonine (domaine PEST),

3.3. La signalisation de Notch

la signalisation Notch se produit via la communication cellule-cellule, où les ligands transmembranaires sur une cellule activent les récepteurs transmembranaires sur une cellule juxtaposée (Siebel and Lendahl, 2017). Elle joue un rôle important dans la différenciation de TH1 et TH2. Les DC expriment les ligands de type delta ou Jagged Notch acquièrent la capacité d'instruire la polarisation des cellules Th1 ou Th2, respectivement (Tindemans et al., 2017b). (Figure 1.6)

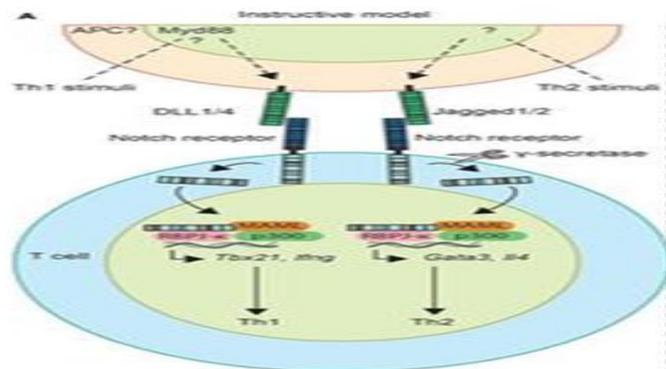


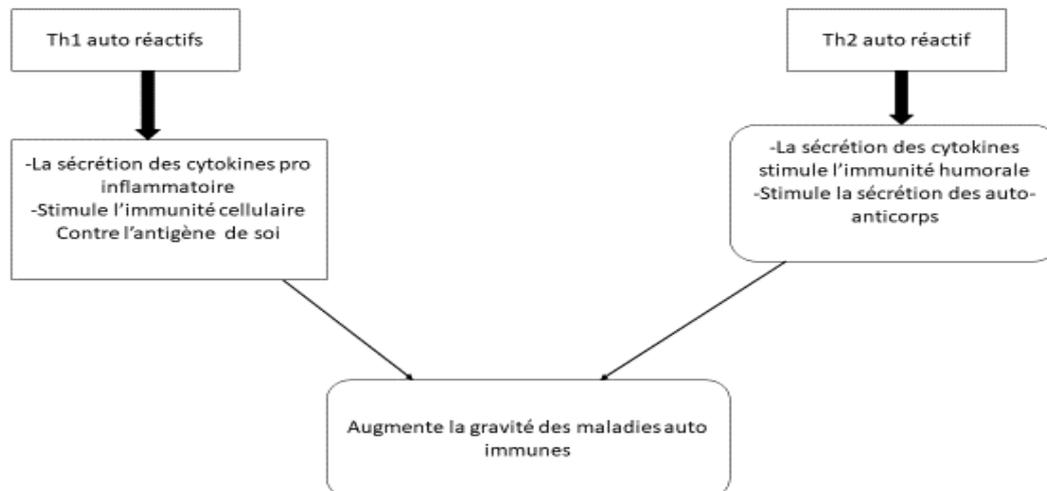
Figure 1.6 : la signalisation Notch dans la différenciation des cellules T helper (TH) (Tindemans et al., 2017b)

La stimulation de Th1 et Th2 induisent respectivement l'expression des ligands delta-like (DLL) et Jagged ligand sur les CPA. Lors de la liaison récepteur-ligand le domaine intracellulaire Notch (NICD) est clivé par un complexe γ -sécrétase et se transloque vers le noyau et se lie à la protéine de liaison du signal de recombinaison du facteur de transcription pour la région J κ de l'immunoglobuline (RBPJ κ). Enfin, des protéines co-activantes supplémentaires sont recrutées, telles que les protéines de type cerveau (MAML1-3) et p300 pour induire l'activation de la transcription du gène du facteur de transcription Th1 Tbx21 et de la cytokine signature Ifng . Pour la différenciation Th2, Notch induit la transcription de Gata3 et Il4, active aussi les gènes de la production des cytokines(Tindemans et al., 2017b)

3.4. Notch et la dichotomie de TH1 et TH2 dans l'auto-immunité

Le récepteur Notch favorise la polarisation de Th1 et Th2 .Lors la liaison entre ligand DLL et Notch le TCD4⁺ se différencie en th1 et activé la sécrétion des cytokines pro inflammatoire, ce profil pro inflammatoire va augmenter les lésions tissulaires et faire progresser la sévérité

des maladies auto-immunes et la liaison entre le ligand Jagged et NOTCH exprimé par THCD4+ se différencie en Th2. L'auto réactivité de Th2 joue un rôle dans l'activation de l'immunité humorale qui augmente la sécrétion des auto-anticorps conduit la gravité des maladies auto-immunes.



4. PCR (Polymérase Chaîne Réaction)

4.1. Définition

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) est un test enzymatique simple mais élégant qui permet l'amplification d'un fragment d'ADN spécifique à partir d'un pool complexe d'ADN. Le Dr Kary Mullis, qui a découvert le test PCR, a déclaré qu'il «vous permet de choisir le morceau d'ADN qui vous intéresse et d'en avoir autant que vous le souhaitez» (Mullis, 1990), (Garibyan and Avashia, 2013)

4.2. Principe :

La technique de la PCR se base sur les principes suivants :

- Connaitre les séquences d'intérêts pour synthétiser des amorces spécifiques.
- Synthèse des séquences complémentaires d'ADN ou d'ARN par des amorces spécifiques constitués d'oligonucléotides de synthèse des 20 à 25 nucléotides.

- Synthèse enzymatique et l'initiation spécifique à l'ADN double brins à l'ADN polymérase.

- La répétition de cycle de transition de la température contrôlée par un thermocycleur.

4.3. Les étapes de la PCR :

Etape 1 (dénaturation) : l'ADN en hélice double brins est séparé à 95 °C pendant 5 minutes.

Etape 2 : hybridation des amorces a 50 – 60 °C pendant une minute.

Etape 3 : élongation de nouveau brin complémentaire synthétisé à l'aide de Taq polymérase a 72 °C pendant une minute.

4.4. Les acteurs de PCR :

4.4.1.L'ADN : une hélice double brins, sur lesquelles se trouvent les fragments à amplifier.

5.4.2.Les amorces sens et anti sens : ou les oligonucléotides de synthèse d'environ 20 à 25 nucléotides, capables de s'hybrider d'une manière spécifique aux ADN à amplifier pour synthétiser un brin complémentaire d'ADN. Les amorces sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier.

5.4.3.Taq polymérase : une enzyme thermorésistante extraite à partir des bactéries *Thermus aquaticus*, résistante aux transitions de la température et induit à l'automatisation de la PCR.

5.4.4.Les nucléotides (dNTPs (désoxy Nucléotides Triphosphates)) : dGTP, dCTP, dATP, dTTP, qui sont les éléments de base utilisés par la Taq Pol utilisées pour synthétiser le brin complémentaire d'ADN à amplifier.

Problématique :

NOTCH est un récepteur transmembranaire impliqué dans la différenciation et la polarisation de TH1 et TH2 qui ont un effet différent dans l'auto-immunité. La protéine a un effet sur les maladies auto-immunes, pour cela l'étude du gène de ce récepteur par les méthodes de la biologie moléculaire tels que la PCR peut aider les chercheurs à cibler la molécule comme une nouvelle méthode de contrôler et traiter les maladies.

Objectif :

Concevoir la bonne paire d'amorces pour le gène Notch à l'aide de la PCR et du logiciels de bio-informatique Primer Blast.

But :

Choisir la bonne paire d'amorces conçus par le Primer Blast qui assurent une bonne amplification de la PCR. Ceci permettra comme perspective d'étudier les associations entre le récepteur Notch et la dichotomie de TH1 et TH2 dans l'auto-immunité.

Matériels et Méthodes

1. Conformation d'amorce :

La conception d'amorces appropriées est un paramètre essentiel au succès d'une expérience de PCR. Lors de la conception d'un ensemble d'amorces pour une région spécifique d'ADN désirée pour l'amplification, une amorce doit s'hybrider au brin plus, qui par convention est orienté dans la direction 5' → 3' (également connue sous le nom de brin sens) et une autre amorce doit compléter le brin moins, qui est orienté dans la direction 3' → 5' (brin anti sens ou matrice). Une amorce mal conçue peut empêcher le fonctionnement de la réaction PCR à cause des problèmes courants qui surviennent lors de la conception d'amorces:

- 1) auto-hybridation des amorces entraînant la formation de structures secondaires telles que des boucles en épingle à cheveux.
- 2) hybridation des amorces les unes aux autres, plutôt qu'à la matrice d'ADN, créant des dimères d'amorce (Lorenz, 2012)

1.1. Sélection d'amorce

Plusieurs variables et facteurs doivent être pris en considération lors de la conception des amorces pour la PCR. Les plus importantes sont:

1. La longueur de l'amorce : qui doit être de 15 à 30 résidus nucléotidiques (bases).
2. La teneur optimale en GC : qui doit être comprise entre 40 et 60%.
3. L'extrémité 3' des amorces doit contenir un G ou C afin de serrer l'amorce et d'empêcher la "respiration" des extrémités, augmentant ainsi l'efficacité de l'amorçage. 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 augmentent également la température de fusion des amorces.

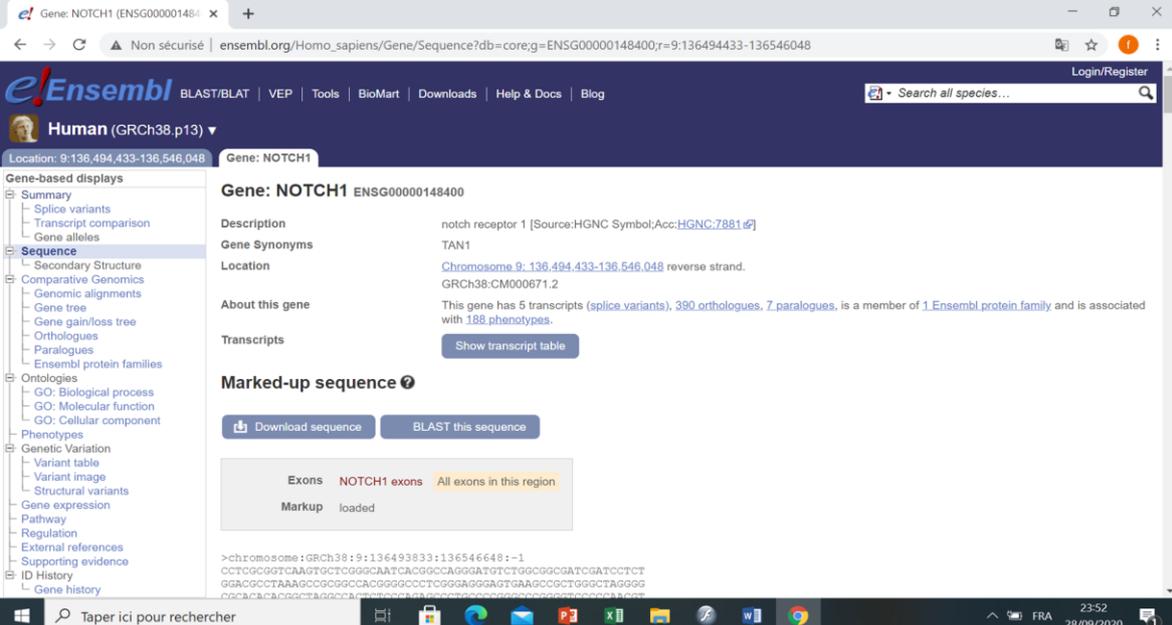
4. Les extrémités 3' d'un ensemble d'amorces, qui comprend une amorce de brin plus et une amorce de brin moins, ne doivent pas être complémentaires l'une de l'autre, et l'extrémité 3' d'une seule amorce ne peut pas non plus être complémentaire d'autres séquences de l'amorce. Ces deux scénarios aboutissent à la formation de dimères d'amorce et de structures en boucle en épingle à cheveux, respectivement.

5. Les températures de fusion optimales (T_m) pour les apprêts se situent entre 52 et 58 ° C, bien que la plage puisse être étendue à 45-65 ° C. La T_m finale pour les deux amorces ne doit pas différer de plus de 5 ° C.

6. Les répétitions de di-nucléotides (par exemple, GCGCGCGCGC ou ATATATATAT) ou les analyses d'une seule base (par exemple, AAAAA ou CCCCC) doivent être évitées car elles peuvent provoquer un glissement le long du segment amorcé de l'ADN et / ou des structures en boucle en épingle à cheveux. Si cela est inévitable en raison de la nature de la matrice d'ADN, n'incluez que des répétitions ou des analyses de base unique avec un maximum de 4 bases.

2. Recherche de la séquence de référence du gène Notch .

La conception des amorces commence par la recherche de la séquence de référence du gène Notch (Notch1 sur la base de données « Ensembl » accessible sur le site « www.ensembl.org » comme illustré sur Figure 2.1.



The screenshot shows the Ensembl genome browser interface for the NOTCH1 gene. The browser address bar shows the URL: ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Sequence?db=core;g=ENSG00000148400;r=9:136494433-136546048. The page title is "Gene: NOTCH1 (ENSG00000148400)". The main content area shows the gene name "Gene: NOTCH1 ENSG00000148400" and a description: "notch receptor 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7881]". The location is given as "Chromosome 9: 136,494,433-136,546,048 reverse strand." The "Marked-up sequence" section shows the sequence with exons highlighted in orange. The sequence is:

```
>chromosome:GRCh38:9:136493833:136546648:-1
CCTCGCGTCAAGTGTCTGGGCAATCACGGCCAGGATGTCTGCGGGATCGATCTCT
GGACDCTTAAAGCCGGCCACGGGCGCTCGGAGGATGAAAGCCCTGGGTAAGG
CGACACACGGCTAGCCCAAGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
```

Figure 2.1 : Séquence du gène codant Notch1 sur le site ensembl.org.

La figure représente une partie de la séquence du gène Notch1 qui ont été trouvé sur la base des données « ENSEMBL », tandis que :

- Les bases représentées en noire sont les séquences non codantes dites : introns.
- Les bases représentées en rouge sont les séquences codantes et dites : exons.

Les séquences de gène Notch sont copiées dans un document Word pour facilité notre recherche, puis une séquence de ce gène est encadrée afin de simplifier la recherche des

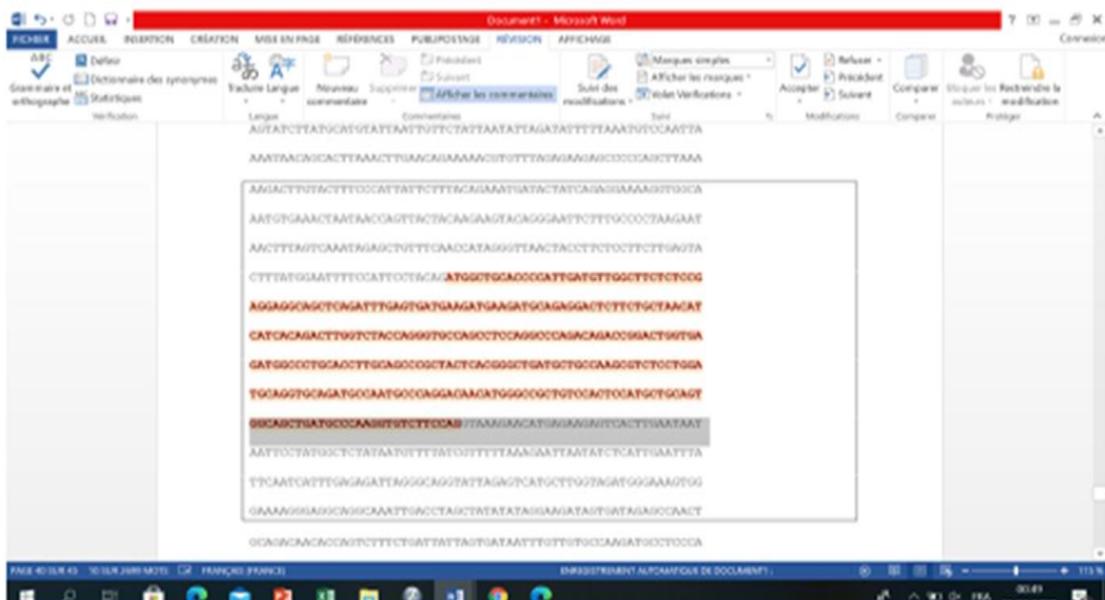


Figure 2.2 : Séquence de gène Notch1 d'intérêt copié dans le document word .

3. Le design des Primer

Dans les ressources du National Center for Biotechnology Information (NCBI) nous avons utilisé le logiciel Primer blast disponible sur le site (www.ncbi.nlm.nih.gov) afin de concevoir les amorces recherchées.

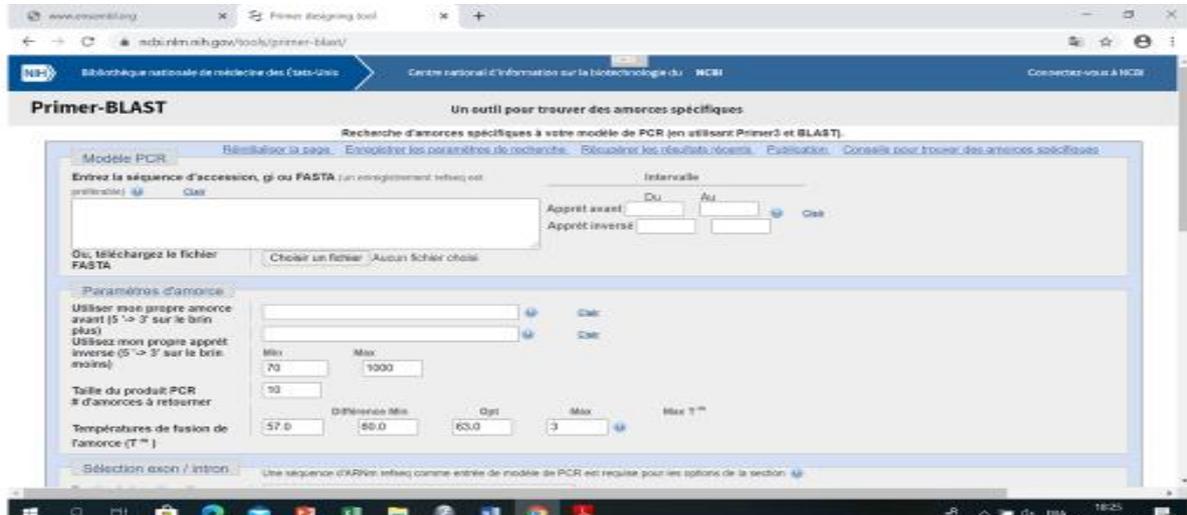


Figure 2.3 : L'outil Primer blast.

La séquence d'intérêt doit être copiée dans le "Primer blast", puis on change quelques paramètres afin que l'outil nous conçoive les amorces recherchées.

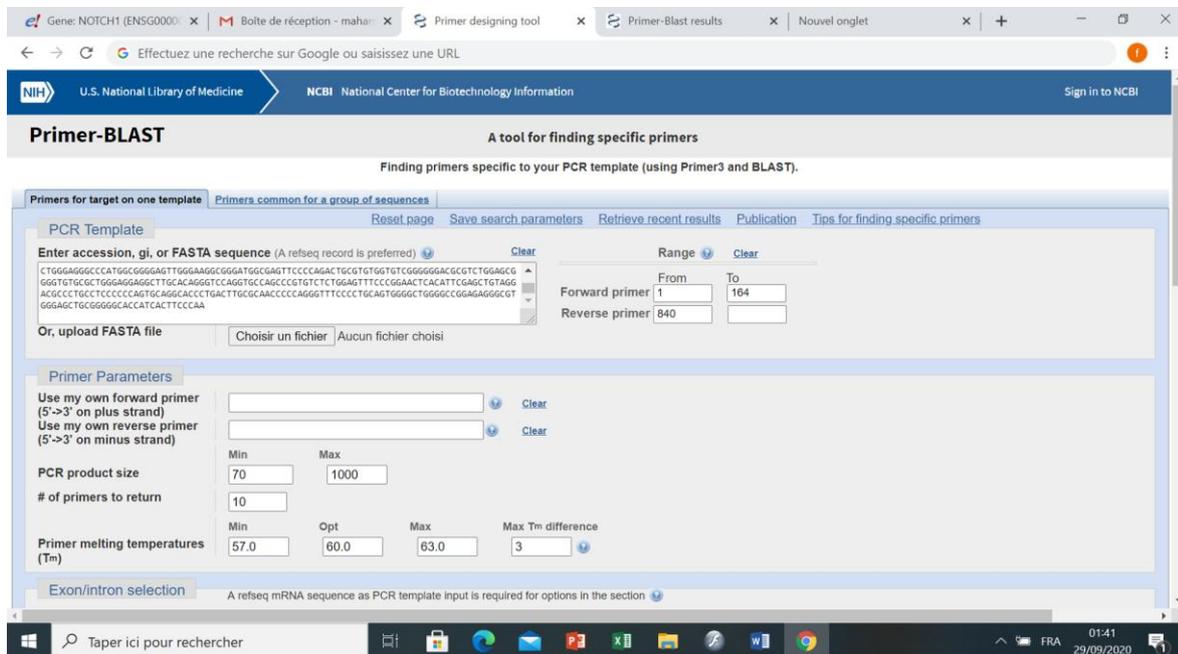


Figure 2.4: La séquence du gène Notch1 copiée sur le logiciel Primer blast.

4. Analyse des Résultats du Primer Blast

Le couple d'amorces choisi doit répondre aux critères suivant:

- Le minimum de produits aspécifiques, afin de n'amplifier que le produit étudié.
- Les températures d'hybridation des deux amorces doivent être le plus proches possibles, car la température d'hybridation lors d'une PCR est programmée en une seule température.
- La teneur en GC doit être proche de 40%
- Ignorer les produits aspécifiques de plus de 1000 pb, car lors d'une PCR il est moins probable d'amplifier une séquence de plus de 1000 Pb

Résultats et prescriptives

1 .Résultats de la conception des amorces

Les résultats obtenus sur le logiciel Primer Blast sont illustrées dans les figures ci-dessous :

Primer pair 2	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGGAGCTGTGGTCCTTCATC	Plus	20	2	21	60.11	60.00	4.00	1.00
Reverse primer	GGAAGTGATGGTGCCCCC	Minus	18	897	880	60.04	66.67	4.00	3.00
Product length	896								

Products on potentially unintended templates

>NC_000009.12 Homo sapiens chromosome 9, GRCh38.p13 Primary Assembly

product length = 896
Features associated with this product:
[neurogenic locus notch homolog protein 1 preproprotein](#)
[neurogenic locus notch homolog protein 1 isoform XI](#)

Forward primer 1 GGGAGCTGTGGTCCTTCATC 20
Template 136523367 136523348

Reverse primer 1 GGAAGTGATGGTGCCCCC 18
Template 136522472 136522489

product length = 1883
Features flanking this product:
[897176 bp at 5' side: E3 ubiquitin-protein ligase TRIP32](#)
[105711 bp at 3' side: toll-like receptor 4 isoform A precursor](#)

Figure 3.1 : Résultats de conception des amorces par le Primer Blast du gène Notch1

2. Interprétation des résultats

Les 2 paires d'amorces qu'on a choisi pour le gène Notch1e répondent aux critères d'une bonne paire d'amorces, dont la taille de produits spécifique est de 896 pb alors que la taille des 4 produits aspécifiques est supérieure à 1000 pb qui est généralement difficile à être séquencer par la PCR. Les 2 paires d'amorces conçus par le Primer Blast sont donc bien spécifiques à notre gène d'intérêt.

La température de fusion de ces amorces est environ 59 c° donnant un meilleur résultat pour une longueur comprise entre 18 et 20 nucléotides, une teneur en GC se situant entre 40 à 60 %, ce qui augmente la spécificité ainsi que l'efficacité de l'amplification.

3. Confirmation des résultats

Nous avons soumis les séquences des amorces à une analyse de confirmation qui s'est faite sur le site bio-informatique (<https://genome.ucsc.edu/>).



Figure 3.2 : site de confirmation des amorces In-Silico PCR.

Ces résultats nous confirment la fiabilité et la spécificité des amorces que nous avons conçues à partir de la conformation de locus du gène Notch1 sur le chromosome 9 et le gène Notch2 sur le chromosome 1 respectivement

Gene: NOTCH1 (ENS0000) x Boîte de réception - mahar x UCSC In-Silico PCR x Primer-Blast results x Nouvel onglet x | + -

Non sécurisé | genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?hgslid=907360747_gnra05Gr7coGITyC5dAwgEeMuA4F&org=Human&db=hg38&wp_target=genome&wp_f=...

Genomes Genome Browser Tools Mirrors Downloads My Data Projects Help About Us

UCSC In-Silico PCR

```
>chr9:136522472-136523367 896bp GGGAGCTGTGGCTTCATC GGAAGTATGATGCCCC
GGGAGCTGTGGCTTCATCtgcacaaggcgaacggctctcaccgcaaggc
ctgaggatcaaatgtatagaccctaggtagcccaaggctggcaacctc
caggtagctgaaggaggaggcccgctcggggagcagtagggcca
gcacaccctctgtcccttctctcaggaaatcgtgcagcaggctg
accgtggcctccaaccctgccaacggtagcagctcctgacctc
gaggctcctacatctgccaactgccaaccagcttccatggcccactg
cggcaggatgtcaacgagtagggcagaagccgggctttgcccacag
gggacctgccaacgaggctgacctcaccgctgctcgcgcggcc
accacaactggcccaactgagcggcctcagtgccctgagccctc
gacctcagaaggggcactgcccaccaggcgaactcaccacag
agtgcctcctgctcaggtagctgcccgtggccggggtagcagagc
cctccccggctcagccaggccaggaggaggaaaggccctgtag
gggtagcctggggggccatggcggggggtggggaggaggaggagg
agtccccagactgagtagggtagggggggcagctcaggaggagg
tgctggggaggcttgacagggtcagtgccacccgtctctg
gagttccggaaactcattcagctgtaggagccctcctccccca
gtcaggaccctgacttgcaacccccagggtttccccctgagtaggg
ctggggcggaggaggtggagctgGGGGGACCATCACTTC
```

Primer Melting Temperatures

Forward: 62.0 C gggagctgtgctcttcate
Reverse: 63.7 C ggaagtgtgtagcccc
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](#).

Help

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

Taper ici pour rechercher

FRA 01:52 29/09/2020

Figure 3.4: Confirmation des résultats 1.

CONCLUSION

Les maladies auto-immunes sont différentes mais leur physiopathologie sont communs . qui sont caractériser par l' auto réactivité de système immunitaire .

Le gène NOTCH joue un rôle dans la polarisation de lymphocyte TCD4+ en th1 qui secrètent des cytokines pro inflammatoire comme IFN gamma ,IL-2 . Ces dernières stimulent les lymphocyte cytotoxicités qui vont augmenté les lésions tissulaires et la progression de la maladie auto-immune , et la stimulation auto réactifs th2 de la cytokine anti inflammatoire, IL4 , IL5, IL10, IL13 qui favorise l'expression des auto-anticorps . l'utilisation de la technique de la PCR devienne nécessaire pour étudier l'effet Du gène NOTCH dans la maladie.

Le blocage de gène NOTCH ou leur ligand peut devenir une thérapeutique ciblé pour lutte contre déférents maladies auto-immunes

L'étude de gène codant pour le récepteur Notch par la technique de la PCR nécessite de concevoir les bonnes paires d'amorces qui répond aux critères mentionner dans notre étude, pour cela il existe plusieurs méthodes de la bio-informatique qui nous facilitent notre choix d'amorce idéale pour une meilleur amplification de notre séquence du gène d'intérêt.

Bibliographie

1-Arruga, F., Vaisitti, T., and Deaglio, S. (2018). The NOTCH Pathway and Its Mutations in Mature B Cell Malignancies. *Front. Oncol.* 8, 550.

Davidson, A., and Diamond, B. (2001). Autoimmune Diseases. *N. Engl. J. Med.* 345, 340–350.

2-Delévaux, I., Chamoux, A., and Aumaître, O. (2013). Stress et auto-immunité. *Rev. Médecine Interne* 34, 487–492.

3-Dragin, N., Le Panse, R., and Berrih-Aknin, S. (2017). Prédiposition aux pathologies auto-immunes: Les hommes ne manquent pas « d'Aire ». *Médecine/Sciences* 33, 169–175.

4-Garibyan, L., and Avashia, N. (2013). Polymerase Chain Reaction. *J. Invest. Dermatol.* 133, 1–4.

6-Hori, K., Sen, A., and Artavanis-Tsakonas, S. (2013). Notch signaling at a glance. *J. Cell Sci.* 126, 2135–2140.

7-Muller, S. (2017). Autophagie, auto-immunité et maladies auto-immunes. *Médecine/Sciences* 33, 319–327.

8-Sauma, D., Espejo, P., Ramirez, A., Fierro, A., Roseblatt, M., and Bono, M.R. (2011). Differential Regulation of Notch Ligands in Dendritic Cells upon Interaction with T Helper Cells: T Cells Regulate Notch Ligands in Dendritic Cells. *Scand. J. Immunol.* 74, 62–70.

9-Siebel, C., and Lendahl, U. (2017). Notch Signaling in Development, Tissue Homeostasis, and Disease. *Physiol. Rev.* 97, 1235–1294.

10-Tindemans, I., Peeters, M.J.W., and Hendriks, R.W. (2017a). Notch Signaling in T Helper Cell Subsets: Instructor or Unbiased Amplifier? *Front. Immunol.* 8, 419.

11-Tindemans, I., Peeters, M.J.W., and Hendriks, R.W. (2017b). Notch Signaling in T Helper Cell Subsets: Instructor or Unbiased Amplifier? *Front. Immunol.* 8, 419.

12. Tindemans, I., Peeters, M.J.W., and Hendriks, R.W. (2017c). Notch Signaling in T Helper Cell Subsets: Instructor or Unbiased Amplifier? *Front. Immunol.* 8, 419.

13. Paul-Gydéon Ritvo Au coeur du contrôle de l'immunité humorale

(Re)définition, mode d'action et répertoire des lymphocytes T folliculaires régulateurs 2017

14- Notch signaling and diseases: An evolutionary journey from a simple beginning to complex outcomes 2018

15 - Conception automatisée d'amorces et de sondes aux fins de diagnostic moléculaire Faculté des Études supérieures et postdoctorales UNIVERSITÉ LAVAL QUÉBEC 2011

16- FOSSO Maxime Né le 4 avril 1993 à Aix-Les-Bains (73), IMPACT DE LA VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE DU RÉPERTOIRE LYMPHOCYTAIRE T $\alpha\beta$ SUR LES RÉPONSES IMMUNITAIRES T-DEPENDANTES EN RÉPONSE À LA VACCINATION OU À L'ORIGINE DE MALADIES AUTO-IMMUNES 2018

17- Mécanismes de la lymphomagenèse au cours des maladies auto-immunes : rôle de la génétique, de l'activité de la maladie et des traitements Gaetane Nocturne cite this version:

Gaetane Nocturne. Mécanismes de la lymphomagenèse au cours des maladies auto-immunes : rôle de la génétique, de l'activité de la maladie et des traitements. Immunité adaptative. Université Paris-Saclay, 2015. Français. NNT : 2015SACL213. tel-01424129

18- Lymphocytes T folliculaires helper et VIH: Unis pour le meilleur et pour le pire

Article in *Medicine sciences: M/S* · October 2017 DOI: 10.1051/medsci/20173310020

19- Déficit immunitaire primitif de l'adulte et auto-immunité Primary immunodeficiency and autoimmunity A. Guffroy a,b,*, V. Giesa a,b, M. Martina a,b, A.-S. Korganowa a,b

a CNRS UPR 3572 « immunopathologie et chimie thérapeutique », laboratoire d'excellence Medalis, institut de biologie moléculaire et cellulaire (IBMC), 67000 Strasbourg, France

b Service d'immunologie clinique et de médecine interne, Centre national de référence des maladies auto-immunes rares, hôpitaux universitaires de Strasbourg, 1, place de l'Hôpital, 67091 Strasbourg, France 2016

20- Reviews Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease S. Romagnani Cattedra di Immunologia Clinica e Allergologia, Istituto di Clinica Medica 3, Università degli Studi di Firenze, Viale Morgagni 85, I-50134 Florence, Italy

21 - L'auto-immunité DFGSM-32012-2013 Pr. Michel Abbal

22- Étude épidémiologique-clinique et biologique des maladies auto-immunes exprimant des facteurs anti-nucléaires: particularité du lupus.

23- BOUCHEKOUT Ryma Le 29/06/2016BAZINE Karima 22Michael ESQUERRE

Le 29 novembre 2007DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE TOULOUSE III

INFLUENCE DES LYMPHOCYTES T CD4+ CD25+ REGULATEURSSUR LA DYNAMIQUE DE FORMATION DE LA SYNAPSEIMMUNOLOGIQUE ENTRE UN LYMPHOCYTE T CD4+ EFFECTEUR ET UNE CELLULE PRESENTATRICE D'ANTIGENE.

24-Notch signaling and diseases: An evolutionary journey from a simple beginning to complex outcomesClaudio Talora a,2008

25-Conception automatisée d'amorces et de sondes aux fins de diagnostic moléculaire

SVN Revision : 3536 2001 26 Thèse de doctorat de l'Université Paris V – Descartes

Ecole doctorale Frontières du VivantAu coeur du contrôle de l'immunité humorale

(Re)définition, mode d'action et répertoire des lymphocytes T folliculaires régulateurs

Présentée par Paul-Gydéon Ritvopour l'obtention du grade de Docteur ès Sciences de l'Université Paris VDirigée par Monsieur le Professeur David KlatzmannPrésentée et soutenue publiquement le mardi 26 septembre 2017

27-Type 1 T helper and type 2 T helper cells:functions, regulation and role in protection and diseaseS. Romagnani

Cattedra di Immunologia Clinica e Allergologia, Istituto di Clinica Medica 3, Universit'i degli Studi di Firenze, Viale Morgagni 85,1-50134 Florence, Italy

28-Déficit immunitaire primitif de l'adulte et auto-immunitéPrimary immunodeficiency and autoimmunity

A. Guffroya,b,*, V. Giesa,b, M. Martina,b, A.-S. Korganowa,b

a CNRS UPR 3572 « immunopathologie et chimie thérapeutique », laboratoire d'excellence Medalis, institut de biologie moléculaire et cellulaire (IBMC),

67000 Strasbourg, France b Service d'immunologie clinique et de médecine interne, Centre national de référence des maladies auto-immunes rares, hôpitaux universitaires deStrasbourg, 1, place de l'Hôpital, 67091 Strasbourg, France23/11/2017

29-médecine/sciences 2000 ; 16 : 186-91Fonctions et régulationde l'activité de signalisation du récepteur Notch

30-Lymphocytes T folliculaires helper et VIH: Unis pour le meilleur et pour le pire

Article in Medecine sciences: M/S · October 2017 .