



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



UNIVERSITE de TLEMCEN
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de
l'Univers
Département de biologie

*LABORATOIRE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE APPLIQUEE ET
IMMUNOLOGIE – BIOMOLIM*

MEMOIRE

Présenté par

Mahieddine Nour Elhouda

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Immunologie

Thème

Conception d'amorce pour le gène ROR γ t exprimé par lymphocyte Th17 au cours de la dichotomie Th17/Treg

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

Présidente	BRAHAMI Nabila,	Maitre C B	Université AbouBekr Belkaid-Tlemcen
Encadreur	SMAHI Mohammed Chems Eddine,	Professeur	Université AbouBekr Belkaid-Tlemcen
Examineur	BENMANSOUR Souheila Amal,	Maitre assistante HU	Université AbouBekr Belkaid-Tlemcen

Année universitaire 2019/2020

Résumé :

Introduction : La dichotomie entre Th17/Treg joue un rôle important dans la régulation de la santé et l'aggravation des maladies, cette dichotomie repose sur un équilibre réglable entre les Th17 qui sont vitales pour la défense immunitaire et souvent dans l'auto-immunité, et les Treg qui sont impliqués dans la tolérance. Le facteur clé ROR γ t de la différenciation des lymphocytes Th17 il est impliqué dans cette dichotomie.

Objectif : Concevoir avec spécificité un couple d'amorces encadrant l'exon 4 du gène *RORC* afin d'initier par la suite l'analyse de ce gène par PCR.

But : Montrer que notre amorce spécifique peut sert à effectuer des analyses PCR pour exploiter la réponse Th17 soulignant une approche adoptive dans la modulation de la dichotomie Th17/Treg ou bien pour détecter les altérations qui touchent notre gène.

Matériels et méthode : Cette étude repose sur la conception d'une paire d'amorces spécifique encadre le gène *RORC* par la recherche de la séquence de gène de ROR γ t avec l'outil « ENSEMBL » dans la base des données NCBI sur le site « www.ensembl.org », puis on ait recherché l'exon approprié et on ait choisi la bonne paire d'amorce à l'aide de logiciel «Primer Blast», sur le site (www.ncbi.nlm.nih.gov) , enfin on ait confirmé et vérifié la fiabilité de résultat avec le logiciel « PCR Insilico » ,via le site (<https://genome.ucsc.edu/>).

Résultats : Le gène *RORC* contient 9 exons. L'exon 4 a permis d'obtenir l'amorce spécifique du gène. Nous avons obtenu 10 paires d'amorces spécifiques du gène *RORC* (exon 4) par l'utilisation du programme primer blast. Finalement, on a choisi la paire d'amorce "6" qui présente les critères optimaux : Température de fusion (directe de 59.41 °C et inverse de 59.75 °C), longueur (directe 20 nucléotides, inverse 20 nucléotides), teneur en CG (directe 50%, inverse 60%), amorce spécifique de 524 pb, et produits aspécifiques tous supérieurs à 1000 pb. Le logiciel « PCR In Silicon » nous a permis de localiser l'emplacement de notre produit spécifique sur le chromosome 1.

Conclusion : En conclusion, nous avons élaboré une paire d'amorce qui encadrent le gène *RORc* de ROR γ t car elle présente les critères optimaux, nos résultats pourrait aidée à exploiter la réponse Th17 soulignant une approche adoptive dans la modulation de la dichotomie Th17/Treg ou bien pour détecter les altérations qui touchent notre gène.

Mots clés : ROR γ t, Th17, Treg, PCR, la dichotomie, amorce.

Abstract:

Introduction: The dichotomy between Th17 / Treg plays an important role in regulating health and worsening disease, this dichotomy is based on an adjustable balance between Th17 which are vital for immune defense and often in autoimmunity, and Tregs which are involved in tolerance. ROR γ t the key factor in the differentiation of Th17 lymphocytes, is involved in this dichotomy.

Objectives: The objective of our study is the design of specific primers, which frame the RORc gene of ROR γ t which has been implicated in the Th17 / Treg dichotomy, using bioinformatics tools.

Aim: To show that our specific primer is used to perform PCR analyzes, and to exploit the Th17 response underlining an adoptive approach in the modulation of the Th17 / Treg dichotomy, or to detect the alterations that affect our gene.

Materials and methods: This study is based on the design of a specific pair of primers flanking the *RORC* gene, by searching for the ROR γ t gene sequence with the "ENSEMBL" tool in the NCBI database on the "www.ensembl.org", then I searched for the appropriate exon and chose the correct primer pair using "Primer Blast" software, from the site (www.ncbi.nlm.nih.gov), finally I confirmed and checked the reliability of the result with the "PCR Insilico" software, via the site (<https://genome.ucsc.edu/>).

Results: The RORC gene contains 9 exons. Exon 4 obtained the specific primer for the gene. We obtained 10 primer pairs specific for the RORC gene (exon 4) using the primer blast program. Finally, we chose the primer pair " 6 " which presents the optimal criteria: Melting temperature (forward of 59.41 °C and reverse of 59.75 °C), length (forward 20 nucleotides, reverse 20 nucleotides), CG content (50% forward, 60% reverse), specific primer of 524 bp, and nonspecific products all greater than 1000 bp. The "PCR In Silicon" software allowed us to locate the location of our specific product on chromosome 1.

Conclusion: In conclusion, we have developed a primer pair that flank the RORc gene of ROR γ t because it presents the optimal criteria, our results could help to exploit the Th17 response highlighting an adoptive approach in the modulation of the Th17 / Treg dichotomy or help for detecting alterations that affect our gene.

Keywords: ROR γ t, Th17, Treg, PCR, dichotomy, primer

ملخص

مقدمة: يلعب الانقسام بين Th17 / Treg دورًا مهمًا في تنظيم الصحة وتفاقم المرض، ويستند هذا الانقسام إلى توازن قابل للتعديل بين Th17 وهو أمر حيوي للدفاع المناعي وغالبًا في المناعة الذاتية، وTreg التي تشارك في التسامح. العامل الرئيسي RORyt في تمايز الخلايا الليمفاوية Th17 يشارك في هذا الانقسام.

الهدف: الهدف من عملنا هو تصميم زوج من البوادي محددة تحيط بجين RORC الخاص بـ RORyt والذي تم تضمينه في ثنائية Th17 / Treg، باستخدام أدوات المعلوماتية الحيوية.

الغرض: لإظهار أن جهاز التمهيدي الخاص بنا يستخدم لإجراء تحليلات PCR لاستغلال استجابة Th17 التي تبرز نهجًا متنبئًا في تعديل انقسام Th17 / Treg أو للكشف عن التعديلات التي تؤثر على جيننا.

المواد والطرق: تستند هذه الدراسة إلى تصميم زوج معين من البادئات يحيط بجين RORC من خلال البحث عن تسلسل الجين RORyt باستخدام أداة "ENSEMBL" في قاعدة بيانات NCBI على "www.ensembl.org"، ثم بحثت عن exon المناسب واخترت زوج البرايمر الصحيح باستخدام برنامج "Primer Blast"، من الموقع (www.ncbi.nlm.nih.gov)، أخيرًا قمت بتأكيد وفحص موثوقية النتيجة باستخدام برنامج "PCR Insilico"، عبر الموقع (<https://genome.ucsc.edu>).

النتائج: يحتوي جين RORC على 9 إكسونات. سمح لنا إكسون 4 بالحصول على منتج محدد للجين. حصلنا على 10 أزواج من البادئات الخاصة بجين RORC (إكسون 4) باستخدام برنامج PrimerBlast. أخيرًا، اخترنا زوج التمهيدي "6" الذي يقدم المعايير المثلى: درجة حرارة الانصهار (للأمام 59.41 درجة مئوية وعكس 59.75 درجة مئوية)، الطول (20 نيوكليوتيدات أمامية، 20 نيوكليوتيد عكسي)، محتوى CG (50٪ للأمام، 60٪ للعكسي)، ومنتج محدد من 524 نيوكليوتيدات، ومنتجات غير محددة كلها أكبر من 1000 نيوكليوتيدات. سمح لنا برنامج "PCR In Silicon" بتحديد موقع منتجنا المحدد على الكروموسوم 1.

الخلاصة: في الختام، قمنا بتطوير زوج تمهيدي يحيط بجين RORC لـ RORyt لأنه يقدم المعايير المثلى، يمكن أن تساعد نتائجنا في استغلال استجابة Th17 التي تسلط الضوء على نهج متنبئ في تعديل تقسيم Th17 / Treg. أو لاكتشاف التغيرات التي تؤثر على الجينات.

الكلمات المفتاحية: RORyt، Th17، Treg، PCR، dichotomy، primer.

Avant-propos

Ce travail exceptionnel a été réalisé dans des conditions très difficiles liées à la crise mondiale "Pandémie de Covid-19" et les conditions de quarantaine. C'est avec fierté et satisfaction que je vous présente ce travail.

En préambule à ce mémoire nous remerciant ALLAH qui nous aide et nous donne la force, l'espoir et la foi durant ces longues années d'étude.

J'exprime tout d'abord, mes profonds remerciements au professeur Mourad ARIBI directeur et créateur du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie "BIOMOLIM" pour sa grande connaissance en immunologie et expérience qui nous a donné durant ces deux années.

Je remercie Pr SMAHI Mohammed Chems Eddine, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de m'encadrer.

J'adresse également mes remerciements à Dr. Wafa NOUARI, maitre-assistant classe B, université de Tlemcen, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de diriger ce travail et pour qu'elle nous a trouvé des thèmes nouveaux, extraordinaires très adaptées aux conditions.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Mlle. Aida MESSAOUD, pour la pertinence de ses remarques et pour sa gentillesse.

Je remercie l'équipe de formation d'immunologie et tous les membres de ma promotion 2020 pour leurs aides durant mes années universitaires.

Je remercie également Dr BRAHAMI Nabila et Dr BENMANSOUR Souhiela Amal de m'avoir fait l'honneur de participer au jury de cette mémoire.

En fin, je remercie ma petite adorable famille, mes grands-parents, et ma copine Fatima, pour leur amour, leur soutien et pour leur support mes sautes d'humeur. J'espère les rendre fiers de moi.

A tous ce qui se sont résignés à mon existence.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
ملخص	v
Avant-propos	vi
Table des matières	vii
Listes des figures	viii
Liste des tableaux	ix
Liste des abréviations	x
Introduction	1
1.Chapire1. Revue de la littérature	2
1.1.ROR gamma t	2
1.1.1. Généralités	3
1.1.2. Définition	3
1.1.3. Génome	3
1.1.4. Mécanisme de régulation transcriptionnelle de ROR γ t	3
1.1.5. Expression	4
1.1.6. Rôle et fonction	4
1.1.7Structure	5
1.2. Lymphocyte T helper 17 (Th17)	7

1.2.1. Généralités.....	7
1.2.2. Différenciation des LTh17.....	7
1.2.3. Origine.....	8
1.2.4. Caractéristiques et fonctions.....	8
1.2.5. La signalisation.....	9
1.2.6. Régulation de la réponse TH17.....	10
1.2.7. Fonctions immunitaires	11
1.3. Lymphocyte T régulateurs (Treg).....	12
1.3.1. Définition	12
1.3.2. Marqueurs.....	12
1.3.3. Origine et épigénétique	12
1.3.4. Rôles.....	13
1.4. La dichotomie et la différenciation des sous-population Treg et Th17	13
1.4.1. La balance Treg / Th17.....	14
1.5. PCR (Polymerase Chain Reaction)	15
1.5.1. Définition.....	15
1.5.2. Principe.....	15
1.5.3. Les auteurs	15
1.5.4. Les étapes.....	16
1.5.5. La visualisation.....	16
1.5.6. Les types	17

1.6. Choix d'amorces	17
1.6.1. Définition	17
1.6.2. Choix d'amorces de PCR.....	17
1.6.2.1. La spécificité	17
1.6.2.2. Les outils.....	17
1.6.2.3. Recherche de bonnes amorces.....	18
1.7. Problématique	18
2.Chapitre 2. Matériels et méthodes	19
2.1. Conception des amorces pour la PCR	19
2.2. Sélection des amorces	19
2.2.1.La longueur de l'amorce.....	19
2.2.2. La température de fusion (T_f)	19
2.2.3. La spécificité	20
2.2.4. La complémentarité	20
2.2.5La teneur en G/C et les suites poly pyrimidine (T, C) ou poly purine (A, G).....	20
2.2.6.La séquence à l'extrémité 3	20
2.3. <i>RORC</i> et <i>RORyt</i>	21
2.4.La séquence du gène <i>RORC</i>	21
2.5.Le design de primer	23
2.6.Les caractéristiques d'une bonne paire d'amorce	26
3. Chapitre 3. Résultats	27

3.1.Résultats de primer blast	27
3.2.Interprétation des résultats	28
3.3.Confirmation des résultats	29
3.4.Perspectives.....	29
4. Chapitre 4. Conclusion générale.....	31
5. Chapitre 5. Bibliographie	32

Liste des figures

Figure 1.1. Structure schématique des domaines du ROR γ et leurs isoformes

Figure 1.2. Mécanisme de régulation transcriptionnelle par ROR γ

Figure 1.3. Fonctions Biologiques de ROR γ t

Figure 1.4. Structure schématique des récepteurs nucléaires

Figure 1.5. Les facteurs de signalisation et de transcription dans la régulation de la différenciation cellulaire des Th17

Figure 1.6. La dichotomie et la différenciation des sous-population Treg et Th17

Figure 2.1 : La base de données "Ensembl"

Figure 2.2: La recherche de notre gène exact *RORC*

Figure 2.3: La description du gène *RORC*

Figure 2.4: La séquence de gène *RORC*

Figure 2.5 : L'exon 4 encadrée

Figure 2.6 : L'outil Primer BLAST

Figure 2.7 : La numération des bases

Figure 2.8 : Analyse de la séquence d'intérêt par le Primer blast

Figure 2.9 : l'obtention des résultats à travers le primer blast

Figure 2.10 : La confirmation de notre gène

Figure 3.1 : Résultat de primer BLAST

Figure 3.2 : Résultat 2 de primer BLAST

Figure 3.3 : Résultat 3 de primer BLAST

Figure 3.4 : Confirmation des résultats par le logiciel PCR In Silico

Liste des tableaux

Tableau 01 : résultats de la conception

Liste des abréviations

Liste des abréviations

A

AHR : Aryl hydrocarbon receptor

AF : fonction d'activation

AR : récepteur des androgènes

ARN : Acide ribonucléique

AP : protéine activatrice

B

BATF : Basic leucine zipper transcription factor facteur de transcription activant les cellules B

B-cell lymphoma-extra large

C

CCL: CC chemokine ligands

CCR: CC chemokine receptor

CD: cluster of differentiation

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CNS : séquence non codante conservée

CTE : extension C-terminale

CTLA4 : cytotoxic T-lymphocyte antigen-4

CXCL: C-X-C ligand

D

DBD: DNA-binding domain

DN : double négatif

DP : double positif

E

E-FABP : protéine de liaison aux acides gras épidermiques

ER : récepteur des œstrogènes

F

FOXP3 : forkhead box P3

G

G-CSF: Granulocyte-Colony Stimulating Factor

GITR: glucocorticoid-induced tumor necrosis factor-related receptor

GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

GR : récepteur de glucocorticoïde

Liste des abréviations

I

INF : Interféron

IL- : Interleukin

IRF : facteur inductible par l'interféron

L

LB : Les lymphocytes B

LBD : ligand binding domain

LT Rb : récepteur de lymphotoxine-b

LTi : cellules inductrices du tissu lymphoïde

M

MCP1 : Monocyte Chemoattractant Protein

N

NFAT : facteur nucléaire des cellules T activées

NR : récepteurs nucléaires

NOD2 : nucleotide oligomerization domain receptors

P

PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns

PNN : polynucléaires neutrophiles

PPAR γ : récepteur activé par proliférateur de peroxysome γ

PTREG : Tregs périphériques

R

RAR : récepteur de l'acide rétinoïque

ROR : récepteurs orphelins liés aux acides rétinoïdes

RORE : les éléments de la réponse ROR

ROR γ t : récepteur orphelin lié à l'acide rétinoïque γ t

S

Smad : small Mothers Against Decapentaplegic

SOCS : supresseurs de la signalisation des cytokines

SP : simple positif

STAT : transducteur de signal et activateur de transcription

T

TCR : récepteur des cellules T

Th : T helper cells

TGF: Transforming Growth Factor

Liste des abréviations

TGF β : Transforming Growth Factor-beta

TLR2: Toll-like receptors

TNF: tumor necrosis factors

T TREG : Treg thymique

TR : récepteur de l'hormone thyroïdienne

V

VDR : récepteur de la vitamine D

Introduction

Introduction

Les lymphocytes T CD4 + jouent un rôle majeur dans la défense contre les maladies en orchestrant le système immunitaire. Le bon fonctionnement du compartiment des cellules T CD4+ base sur un équilibre réglé entre les différents sous-ensembles de lymphocytes T. La division du support CD4 était précédemment supposée être dominée uniquement par les sous-ensembles T helper 1 (Th1) et Th2, alors que les preuves récentes montrent que les cellules Th17 et les cellules T régulatrices (Treg) jouent également un rôle important dans la régulation de la santé et l'aggravation des maladies comme l'auto-immunité et le cancer. La dichotomie entre les cellules Th17 et Treg est extrêmement importante pour le maintien d'un environnement immunitaire sain et fonctionnel, ainsi que des effets nocifs se produisent lorsque l'homéostasie entre ces deux sous-ensembles est perturbée.

Les cellules Th17 sont des acteurs vitaux pour la défense de l'hôte contre les agents pathogènes, mais elles sont également impliquées dans des troubles auto-immunes et dans le cancer. Cependant, Les Treg sont nécessaires pour l'auto-tolérance et la défense contre l'auto-immunité mais sont souvent en corrélation avec la progression du cancer. Les cellules Th17 provoquent, tant que les cellules Treg inhibent, l'auto-immunité (Duan et al., 2014; Knochelmann et al., 2018; Lee, 2018).

La génération réciproque des cellules Th17 et Treg est une importance critique. Il existe plusieurs facteurs qui influencent la génération et la dichotomie entre ces cellules, notamment des signaux TCR, des signaux Co-stimulateurs, des signaux des cytokines et de la stabilité des facteurs de transcriptions ROR gamma t et FoxP3 (Duan et al., 2014; Lee, 2018; Rutz et al., 2016).

Le récepteur nucléaire ROR gamma t est un isoforme de ROR γ spécifique aux lymphocytes T et un facteur de transcription clé pour le programme de la différenciation de la lignée des cellules Th17 et pour leur fonction. Il est impliqué directement dans la dichotomie Th17 /Treg (Rutz et al., 2016).

La PCR est largement utile dans divers domaines cliniques et scientifiques. Les tests basés sur la PCR, effectuent des études qualitatives et quantitatives génomiques sophistiquées d'une manière sensible et rapide.

Dans la mise au point de la PCR, le choix des amorces est essentiel pour une amplification efficace. Dans cette d'ordre d'idée, cette étude a pour objectif de concevoir des amorces du gène (*RORC*) exprimé par les lymphocytes Th17 au cours de la dichotomie Th17 /Treg.

1. Chapitre 1. Revue de la littérature

1.1. ROR gamma t

1.1.1. Généralités

Les récepteurs nucléaires (NR), composent une grande famille de facteurs de transcription, qui contrôlent l'expression des gènes complexes dépendant ou non d'un ligand (Rutz et al., 2016). Ils sont responsables des principaux aspects du développement des eucaryotes, de la différenciation cellulaires, de l'homéostasie métabolique et de la reproduction cellulaire (Bain et al., 2007).

La superfamille de NR est divisée en trois familles :

- Des récepteurs pour les hormones stéroïdes comme le récepteur des œstrogènes (ER), le récepteur de glucocorticoïde (GR) ou le récepteur des androgènes (AR).
- Des récepteurs pour les ligands non stéroïdiens, tels que le récepteur de l'acide rétinoïque (RAR), le récepteur de l'hormone thyroïdienne (TR) ou le récepteur de la vitamine D (VDR).
- Un certain nombre de récepteurs qui se lient à divers produits de métabolisme lipidique, y compris les acides gras et les prostaglandines (Rutz et al., 2016).

Un certain nombre de NR (17 NR sur 48 NR) sont dits récepteurs orphelins pour lesquels leurs ligands régulateurs n'ont pas été bien identifiés (ou des ligands nouvellement identifiés par exemple : les acides biliaires) (Bain et al., 2007). Ces récepteurs orphelins liés aux acides rétinoïdes (ROR) se composent de trois membres : ROR α , ROR β et ROR γ , également appelé NR1F1, NR1F2 et NR1F3 (selon le Comité de Nomenclature des Récepteurs Nucléaires) ou RORA, RORB et RORC (selon le Comité de nomenclature des gènes humains) (Rutz et al., 2016).

Chaque gène ROR génère ses isoformes grâce à une combinaison d'utilisation d'exon et d'épissage de promoteur (Figure 1.1). Ces isoformes ne diffèrent que par des domaines aminoterminals. Les ROR et leurs isoformes diffèrent aussi dans leur expression spécifique aux tissus et régulent des processus physiologiques et des gènes cibles différents. (Jetten, 2009a; Jetten and Joo, 2006).

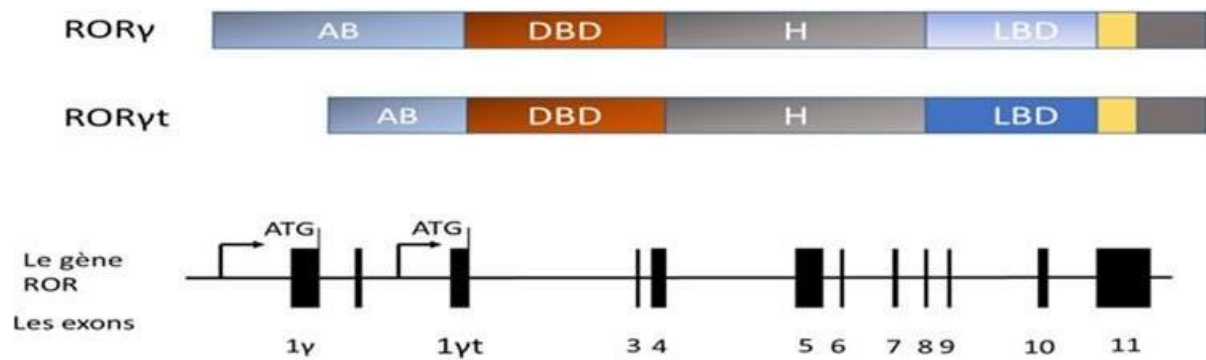


Figure 1.1. Structure schématique des domaines du ROR γ et leurs isoformes (Rutz et al., 2016). ROR γ t est généré par un épissage alternatif de promoteur dans le domaine variable AB. Les autres régions de la protéine sont le DBD, la région charnière (H) et LBD contenant la fonction d'activation 2(AF2). L'utilisation de exons 1 γ pour produit la protéine ROR γ . Ils sont remplacés par un exon unique (exon 1 γ t) pour enfin produire l'isoforme immuno-spécifique ROR γ t (Les 24 premiers acides aminés de ROR γ sont remplacés par 3 résidus de l'exon1 γ t).

1.1.2. Définition

Le récepteur nucléaire ROR γ t est une isoforme de ROR γ spécifique aux cellules immunitaires (Ivanov et al., 2006). Les expériences montrent que les souris déficientes en ROR γ t représentent les caractéristiques suivantes : un manque de plaques de Peyer, des follicules lymphoïdes isolés dans le l'intestin et les ganglions lymphatiques périphériques sont perdus. L'anomalie de ces structures lymphoïdes, expliquent l'absence de cellules lymphoïdes T inductrices (LTi) de tissus chez ces souris déficientes, notez que les LTi dépendantes de ROR γ t. (Eberl et al., 2004; Eberl and Littman, 2003)

1.1.3. Génome :

Les résultats ont révélé que le gène *RORC* a une structure complexe composée de 11 exons séparés par 10 introns. Bien que la plupart des isoformes ROR sont contrôlés par différents promoteurs, mais la régulation transcriptionnelle de leur expression spécifique aux tissus et n'est pas très identifié. (Jetten, 2009b; Medvedev et al., 1997)

Le gène murin se localise sur le chromosome 3 dans la région 3F2.1–2.2, et le *RORC* humain se trouve sur le chromosome 1 q21.3, et couvre environ 24 Kb. (Medvedev et al., 1997)

Jusqu'à présent, la présence des mutations de perte de fonction en ROR γ ou ROR γ t, elle n'a pas très identifié. (Okada et al., 2015)

1.1.4. Mécanisme de régulation transcriptionnelle de ROR γ t

- Deux mécanismes de régulation transcriptionnelle de ROR γ t ont été identifiés :

La liaison d'un agoniste à ROR γ t induit le recrutement de divers coactivateurs visant à recruter l'ARN polymérase II, nucléotidyl transférase responsable de la transcription des gènes cibles.

En revanche, la présence d'un antagoniste, des corépresseurs sont recrutés au ROR γ t et la transcription de gène cible est réprimée. (Figure 1.2)

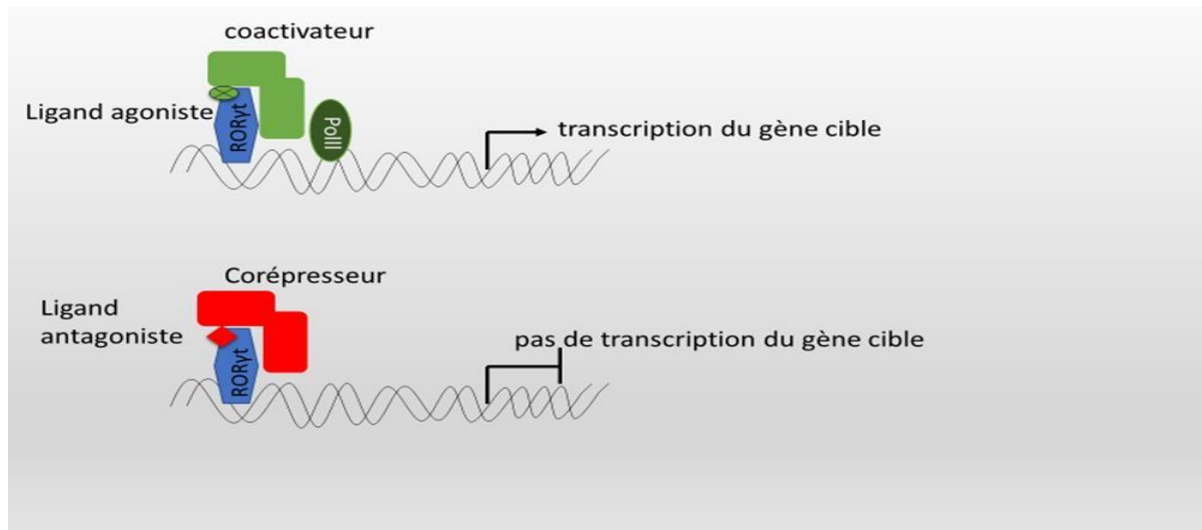


Figure 1.2. Mécanisme de la régulation transcriptionnelle par ROR γ t (Rutz et al., 2016).

1.1.5. Expression

L'ARNm du ROR γ a été détecté dans plusieurs tissus y compris les reins, le foie, les muscles, le cœur, les poumons et le cerveau, mais l'expression de ROR γ t est limitée aux tissus lymphoïdes et un certain nombre des cellules lymphoïdes (Rutz et al., 2016).

1.1.6. Rôle et fonction

Les preuves actuelles montrent que les récepteurs orphelins peuvent hétérodimériser ou se lier sous forme de monomères aux éléments de la réponse afin de remplir leur fonction (Bain et al., 2007).

Pendant la formation des organes lymphoïdes, les cellules stromales expriment le récepteur de lymphotoxine-b (LTbR), et les cellules inductrices du tissu lymphoïde qui résident les ganglions lymphatiques au cours de développement expriment la lymphotoxine-a1 et b2. L'interaction de ces deux derniers entraîne une régulation positive des molécules d'adhésion et des chimiokines, qui facilitent l'attraction et l'accumulation des cellules hématopoïétiques, dans le site de développement des cellules secondaires des organes lymphoïdes. L'expression de ROR γ t est requise pour la différenciation de ces cellules LTi (Eberl et al., 2004; van de Pavert and Mebius, 2010).

ROR γ t est un régulateur clé de la thymopoïèse. En absence de ROR γ t, les souris présentent une atrophie thymique sévère. L'expression de ROR γ t induit le passage du double négatif

(DN) au double positif (DP) dans le stade de développement des cellules T thymiques (Rutz et al., 2016). De plus, l'absence de ROR γ t cause une diminution importante du nombre des thymocytes CD4 + CD8 + (DP) et CD4 + CD8 - et CD8 + CD4 - mature simple positif (SP). Cela est dû à une augmentation significative de l'apoptose dans les cellules DP thymiques (Rutz et al., 2016). En effet, l'expression ciblée de Bcl-xL (facteur anti-apoptotique, B-cell lymphoma-extra large) est contrôlée par le promoteur ROR γ t. Ces souris déficientes en ROR γ t, semblent initialement saines mais à l'âge de 4 ans environ 50% des souris présentent des lymphomes thymiques (Figure 1.2). (Rutz et al., 2016)

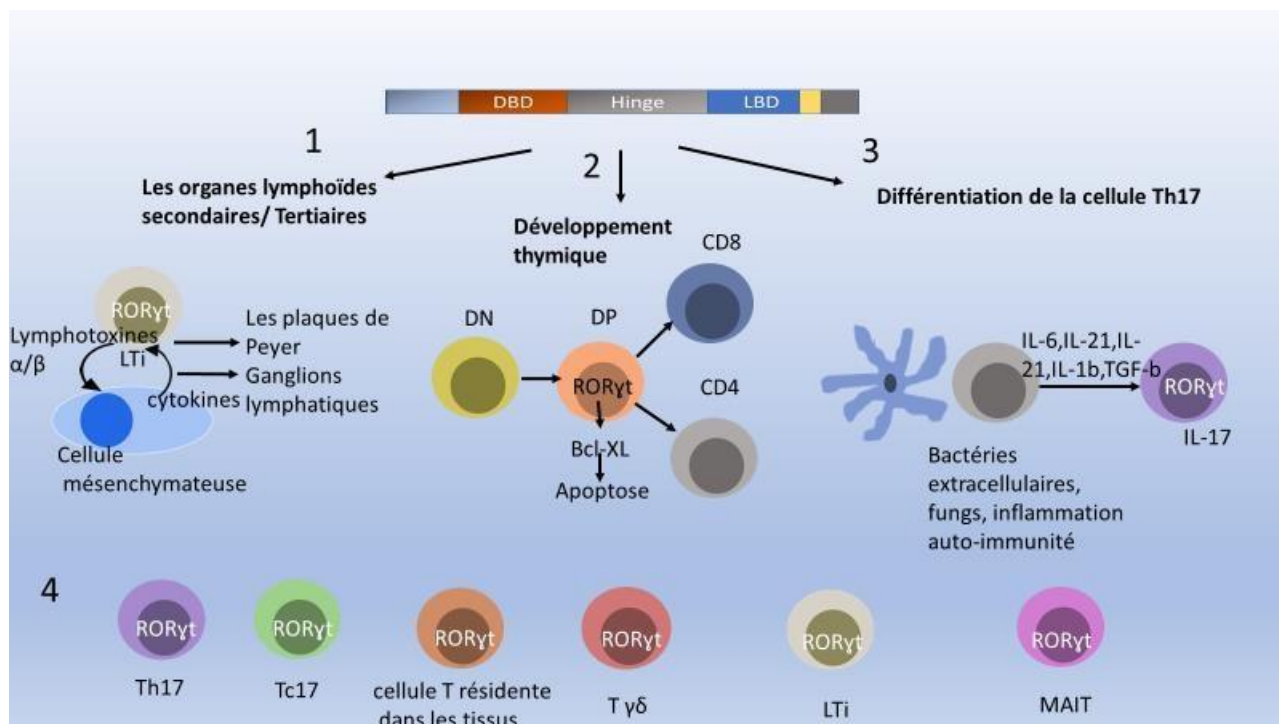


Figure 1.3. Fonctions Biologiques de ROR γ t (Rutz et al., 2016). 1. l'expression de ROR γ t est dépendante, pour le développement de cellules LTi, qui permet le développement des organes lymphoïdes. 2. Pendant le développement thymocytaire, ROR γ t est exprimé dans cellules DP, qui est obligatoire pour leur survie et pour contrôler l'expression du facteur Bcl-xL. 3. ROR γ t est le facteur clé de la transcription des Th17. 4. cellules immunitaires dépendantes du ROR γ t, dans une addition à Th17 cellules, nombreuses autres cellules immunitaires aussi expriment ROR γ t. Les cellules Tc17 (un sous-ensemble des cellules CD8+), Les cellules gdT (principalement situé dans la peau et l'intestin), les cellules T résidentes dans les tissus et les LTi et les cellules muqueuse associé invariant T (MAIT). Ces cellules ne produit pas seulement IL-17.

1.1.7. Structure

Les études ont montré que ces récepteurs nucléaires contenaient deux sous-unités basiques de structure :

La première sous-unité est sous forme un domaine de liaison au ligand au niveau de C-terminal : (LBD) et une liaison à l'ADN est située dans le centre : (DBD). (Hu et al., 2015; Stehlin-Gaon et al., 2003).

Le domaine de liaison au ligand "LBD" occupe un certain nombre de fonctions. Comme son nom indique (ligand binding domain), il contient une poche intérieure spécifique, pour relier le ligand et une fonction pour l'activation de la transcription (AF-2), également nommée (Helix 12) régulée par un ligand. Ce domaine est nécessaire, pour le recrutement des divers coactivateurs et corépresseurs. Les coactivateurs ont la capacité d'interagir avec les protéines, remodelant la chromatine et la machinerie d'activation de la transcription (Rutz et al., 2016). Le LBD est un médiateur principal dans l'autoassemblage, nécessaire pour la liaison des éléments de réponse à l'ADN de haute affinité (Jin et al., 2010; Rutz et al., 2016). Enfin, il adopte un pli à trois couches conservé de 12 hélices α (H1-H12), avec deux ou trois brins formant une structure en feuille plus courte (Rutz et al., 2016), H12 contient le motif consensus AF-2. (Kallen et al., 2004, 2002).

La deuxième sous-unité est le DNA-binding domaine (DBD). Elle lie le récepteur aux éléments hexanucléotidiques situés dans les promoteurs nucléaires, servant comme un transmetteur allostérique d'information à d'autres régions de la molécule réceptrice. D'autre part, le DBD est connecté au LBD *via* une courte séquence d'acides aminés nommée « séquence charnière H » (hinge). La propriété fonctionnelle complète de cette dernière n'est pas encore identifiée, la phosphorylation de la séquence charnière conduit à une activation de la transcription (Bain et al., 2007 ; Hu et al., 2015 ; Rutz et al., 2016 ; Santorin et al., 2015).

DBD est composé de 66 acides aminés dont 9 résidus de cystéine parfaitement conservés. Ce domaine contient deux séquences riches en lysine, cystéine et arginine, formant des structures de doigts contenant la molécule de zinc. Ce motif en doigt de zinc, retrouvé dans d'autres facteurs de transcription, permet au récepteur de se fixer sur la double hélice d'ADN. (Rutz et al., 2016). Il reconnaît également les éléments de la réponse ROR communs (RORE) avec une séquence consensus (WWCWAGGTCA, W = A ou T) (Giguere et al., 1994; Medvedev et al., 1996)

La P-box située dans le DBD, formant une boucle entre les deux dernières cystéines dans le premier doigt de zinc, reconnaît le motif central dans la rainure principale de l'ADN. (Rutz et al., 2016). Des résidus supplémentaires immédiatement en aval du deuxième motif de zinc, nommé extension C-terminale (CTE), déterminent la spécificité de la liaison ROR à l'ADN. (Jin et al., 2010)

Contrairement à la plupart des NR, qui se lient à l'ADN comme hétérodimères ou homodimères, ROR γ t lie leur RORE sous forme de monomères (André et al., 1998; Giguère et al., 1995; Medvedev et al., 1996). La région N-terminale liée au DBD contient des résidus qui activent la fonction transcriptionnelle nommée AF-1, qui peut fonctionner comme un

activateur de transcription indépendant du ligand. AF-1 peut également fonctionner en synergie avec AF-2 (incorporée dans le LBD) (Bain et al., 2007; Rutz et al., 2016).

En résumé, ROR γ t est constitué d'une structure complexe et modulaire qui comprend un domaine de liaison au ligand C-terminal, et un domaine de liaison à l'ADN situé au centre responsable de multiples fonctions pour l'activation transcriptionnelle. Les interactions allostériques entre les sous-unités sont essentielles à la capacité de ces récepteurs nucléaires pour fonctionner comme des commutateurs efficaces de la régulation des gènes. Ces interactions sont couplées à des changements subtils de structure (Figure 1.4) (Bain et al., 2007).

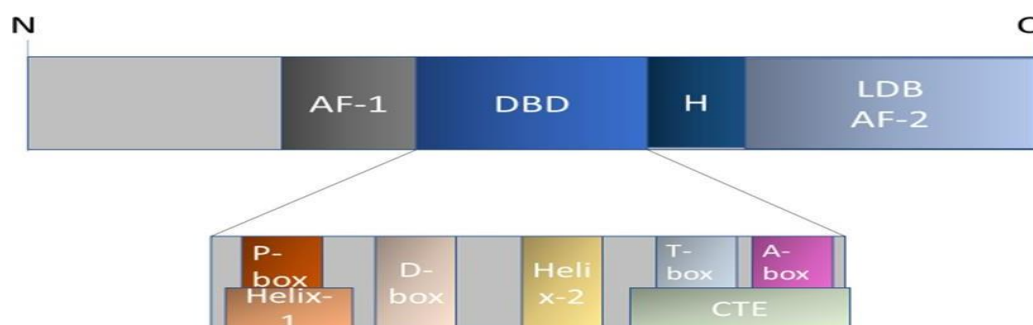


Figure 1.4. Structure schématique des récepteurs nucléaires (Bain et al., 2007).

AF : fonction d'activation ; DBD : le domaine de liaison à l'ADN ; H : la région charnière ; LBD : le domaine de liaison au ligand. Ci-dessous, une vue étendue du DBD indiquant les emplacements relatifs de la boîte P, de la boîte D, de la boîte T, de la boîte A, de l'hélice 1, de l'hélice 2 et du C-terminal d'extension (CTE).

1.2. Lymphocyte T helper 17 (Th17)

1.2.1. Généralités

Avant l'élucidation de la cellule T helper 17 (Th17), en tant que sous-ensemble unique des lymphocytes T CD4+, les chercheurs pensaient que les cellules T CD4+ effectrices entièrement différenciées existaient sous deux formes : les cellules Th1, les effecteurs de l'immunité à médiation cellulaire, et les cellules Th2, qui favorisent la réponse humorale (Eisenstein and Williams, 2009a). Les cellules Th17 comme indique leur nom sont définies comme des lymphocytes T CD4+ sécrétant principalement des quantités importantes d'interleukine 17A (IL-17A) (Alizadeh et al., 2013a)

1.2.2. Différenciation des LTh17 :

Chez la souris, plusieurs cytokines vont jouer un rôle dans l'expansion des LTh17. Les cytokines IL-6 et Transforming Growth Factor-beta (TGF- β) vont induire la différenciation des LTh 0 en LTh17, avec la présence des cytokines inflammatoires comme IL-1, IL-18 et tumor necrosis factors (TNF- α). IL-6 et TGF- β sont indispensables à la différenciation des Th17 par l'induire de la sécrétion autocrine d'IL-21 qui entraîne l'expression de : CCR6 (récepteur de la

chémokine), CCL20 (chemokine ligands), récepteur de l'IL-23 (IL-23R) et le facteur de transcription ROR γ t. Ainsi que les macrophages et les cellules dendritiques stimulés par les cytokines inflammatoires (IL-1 et IL-6) secrètent IL-23, qui aide à la l'expansion et la stabilisation des cellules Th17 en se fixant à l'IL-23R des LTh17, cette liaison (IL-23/IL-23R) induire la sécrétion des cytokines caractéristiques de LTh17 : IL-17F, IL-17A et IL-22. (Samson et al., 2011)

ROR γ t est le principal facteur de transcription des LTh17, il va stimuler STAT3 et la synthèse d'IL-17A et F. D'autres facteurs de transcription participent en synergie avec ROR γ t comme ROR α , interféron régulateur facteur 4 (IRF4) et aryl hydrocarbon receptor (AHR), mais ROR γ t reste le facteur clé de la transcription le plus spécifique des LTh17. (Samson et al., 2011)

1.2.3. Origine

Il a été démontré que, les LTh17 ne génèrent pas à partir LTh0 humains en présence d'IL-6 et de TGF- β seuls. Ces deux derniers n'étant capables d'induire que l'expression de ROR γ t, mais pas la sécrétion d'IL-17 (Samson et al., 2011). Chez l'homme, la différenciation est obtenue sous l'action conjointe de l'IL-1 et l'IL-23 ou l'IL-6 et l'IL1 avec l'association de TGF- β (Samson et al., 2011).

Le précurseur LTh CD4+CD161+ humains est présent dans le thymus, le cordon ombilical et le sang périphérique. Ce précurseur exprime de manière constitutive ROR γ t et IL-23R. Selon l'environnement cytokinique, il peut se différencier en LTh1, LTh2 ou en LTh17. La présence d'IL-23 avec IL-1 dans l'environnement favorise la différenciation en LTh1 ou LTh17, alors que l'ajout de TGF- β inhibe l'expression de T-bet mais pas de ROR γ t, générant donc les Th17 seulement. Les LTh0 qui n'expriment pas le CD161+ sont donc incapables de se différencier en LTh17 en présence d'IL-23 et d'IL-1. (Samson et al., 2011)

1.2.4. Caractéristiques et fonctions

Les caractéristiques phénotypiques principales des LTh17 humains sont représentées par une expression élevée de CCR6, CCR4, CCR2, IL-23R et ROR γ t et l'absence d'expression de CCR5. Les LTh17 sont caractérisés aussi par la sécrétion des différentes cytokines, essentiellement pro-inflammatoires (l'IL-17A, l'IL-17F et l'IL-22). Elles participent à la réponse anti-infectieuse vis-à-vis des pathogènes non pris en charge par les autres lymphocytes et jouent un rôle dans l'entretien ou l'émergence de pathologies dysimmunitaires.

IL-17A et IL-17F, sont des interleukines les plus sécrétées par les LTh17, favorisent l'activation, le recrutement et la migration des macrophages et des polynucléaires neutrophiles (PNN) via la stimulation de la production des chémokines (CXCL1, CXCL8 ou IL-8, CXCL10, MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein)) par les macrophages, les PNN et les cellules épithéliales (cellules coliques, cellules bronchiques, synoviales...). (Samson et al., 2011)

L'IL-17A et F augmentent l'inflammation locale et la destruction des tissus, provoquent la synthèse des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1, TNF- α) ; de Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) et de Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), qui stimulent la granulopoïèse, et la synthèse des prostaglandines et des métalloprotéases. Les cytokines IL-6 et IL-1 produites par les cellules déjà stimulées par l'IL-17 au niveau du site inflammatoire, vont induire une sécrétion d'IL-23 par les cellules dendritiques et les monocytes, ce qui va augmenter la production d'IL-17 par les LTh17. L'IL-17 participe aussi à la formation des centres germinatifs où les lymphocytes b (Lb) vont subir leurs mutations somatiques pour l'augmentation de la spécificité des anticorps sécrétés. (Samson et al., 2011)

Les LTh17 produisent IL-22 et IL-22R sont exprimé d'une manière ubiquitaire par les cellules endothéliales et les cellules épithéliales. L'IL-22 favorise la protection anti-infectieuse au sein des épithéliums en provoquant la production de substances antimicrobiennes comme les défensines. Elle augmente également la résistance transépithéliale et la prolifération des cellules épithéliales. (Samson et al., 2011)

1.2.5. La signalisation

La stimulation du TCR active l'expression des gènes des facteurs de transcription et induit la prolifération des LTh. Le facteur de transcription activant les cellules B (BATF) est activé lors de la stimulation du TCR et stimule la transcription du gène IL-17. La stimulation de TGF- β induit à la fois l'activation de FoxP3, ROR γ t et ROR α . Des concentrations élevées de TGF- β augmentent l'expression de FoxP3 par l'activation de SMAD4 et induisent par la suite la production de TGF- β et suppriment l'activité ROR γ t et la différenciation des Th17. Mais, la présence des cytokines IL-6 ou IL-1 active le transducteur de signal et l'activateur de la transcription STAT3 qui induit l'expression génique des récepteurs d'IL-21 et IL-23, activant une régulation positive autocrine d'IL-21 pour la différenciation des Th17. De plus, IL-1 induit IRF4 qui à son tour stimule la transcription de gène IL-17.

T-bet et Ets-1 antagonisent l'activité ROR γ et fonctionnent donc comme des supresseurs du développement des cellules Th17, et PPAR γ supprime la transcription intrinsèque du gène IL-17 en bloquant l'élimination induite par l'activation des complexes répresseurs du promoteur du gène IL-17. SOCS1 et SOC3 modulent réciproquement la différenciation des cellules Th17. (Figure 1.5)

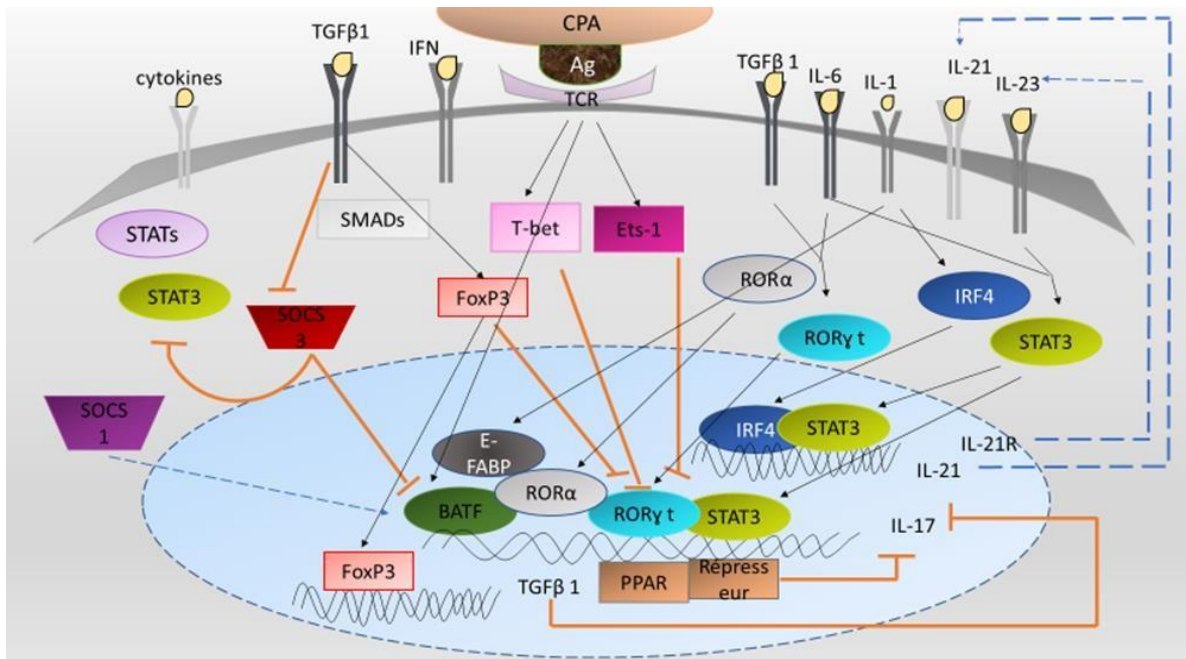


Figure 1.5. Les facteurs de signalisation et de transcription dans la régulation de la différenciation cellulaire des Th17 (Hwang, 2010). TCR : récepteur des cellules T; NFAT : facteur nucléaire des cellules T activées; AP : protéine activatrice; BATF : facteur de transcription activant les cellules B; IL-17 : interleukine-17; TGF β : transformant le facteur de croissance β; RORγt : récepteur orphelin lié à l'acide rétinoïque γ t; STAT : transducteur de signal et activateur de transcription; IRF-4 : facteur 4 inductible par l'interféron; E-FABP : protéine de liaison aux acides gras épidermiques; PPARγ : récepteur activé par proliférateur de peroxydase γ; SOCS, suppresseurs de la signalisation des cytokines.

1.2.6. Régulation de la réponse TH17

Certains agents microbiens, stimulent les cellules dendritiques (DC) pour sécréter l'IL-12 et l'IL-23. En fonction de la dominance de ces cytokines, la différenciation se fera vers Th1 ou Th17. Certains signaux de danger d'origine microbienne (PAMP) ont été déterminés comme inducteurs de la production d'IL-23 par les DC. Ces facteurs incluent les lectines de type C et le zymogène via NOD2, le Toll-like receptors (TLR2), les peptidoglycanes (des substances exprimées par le *Candida albicans*) et les récepteurs des lectines de type C comme dectin-1. (LeibundGut-Landmann et al., 2007; Samson et al., 2011; van Beelen et al., 2007)

Par contre, certaines cytokines inhibent le développement des LTh17. Les cytokines comme IFN-γ et IL-4 induisant les voies LTh2 et LTh1, vont réguler négativement la différenciation de TH17 (Miossec, 2007; Tesmer et al., 2008). Un autre puissant inhibiteur des LTh17 est l'IL-27, il inhibe le développement des maladies auto-immunes induites par les LTh17 telles que l'encéphalite auto-immune expérimentale (Batten et al., 2006; Stumhofer et al., 2006, p. 27). IL-2 est un inhibiteur de développement des LTh17 murins. Il induit le développement des Treg

par l'inhibition de l'expression de ROR γ t avec la stimulation de l'expression de Foxp3 via STAT5. (Samson et al., 2011, p. 17)

Des travaux récents, démontrent que l'acide rétinoïque secrété par les cellules dendritiques des muqueuses, pourrait inhiber l'expression des LTh17 au profit des LTreg. Aussi les cellules dendritiques CD103+ des organes lymphoïdes, des muqueuses et des organes lymphoïdes de l'intestin qui secrètent TGF- β et de l'acide rétinoïque sont des inducteurs puissants de LTreg, ce qui explique la faible infiltration des LTh17 dans les muqueuses intestinales. Donc à ce niveau, il existerait un équilibre entre les défenses anti-infectieuses contre les germes pathogènes (rôle des LTH17) et la tolérance vis-à-vis des germes considérés comme commensaux (rôle des Treg). (Coombes et al., 2007)

Enfin, les LTh17 humains semblent moins sensibles, par rapport aux autres populations lymphocytaires à l'action suppressive des Treg et résistent à l'action suppressive du TGF- β . Les LTh17 ont la capacité d'échapper à certains des mécanismes périphériques de la tolérance, favorisant l'entretien et l'émergence de pathologies auto-immunes et inflammatoires (Samson et al., 2011).

1.2.7. Fonctions immunitaires :

Il a été montré que les LTh17 jouent un rôle défenseur contre les infections pathogènes, l'évaluation de la réponse Th17 a été obtenue par l'utilisation des modèles dans lesquels un des gènes essentiels dans la réponse était validé, comme la sous-unité de l'IL23, les gènes de p19, de l'IL-17 ou du récepteur de l'IL-17A. (Samson et al., 2011)

Les pathogènes induisant la réponse Th17 ne sont pas bien identifiés, mais il a été démontré que certains types de micro-organismes comme *Cutibacterium acnes*, *Citrobacter rodentium*, *Helicobacter pylori*, *Aspergillus fumigatus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides* spp, *Mycobacterium tuberculosis* et *Candida albicans*, causent une réponse Th17 avec une forte sécrétion d'IL-17. L'importance de la réponse Th17 dans les infections parasitaires et virales est controversée. (Samson et al., 2011)

Parmi les mécanismes incriminés, pour déclencher une réponse essentiellement Th17 par les agents infectieux, on invoque les propriétés du facteur pathogène lui-même qui stimule les cellules de l'immunité innée pour synthétiser des cytokines inflammatoires particulières comme l'IL-23. Les patients qui ont un déficit génétique dans la réponse IL-23/IL-17 ne peuvent pas contrôler les infections fongiques (Ma et al., 2008). Mais l'inflammation médiée par une production dérégulée d'IL-17 causerait l'activation de LTh17 pathogènes qui entretiendraient l'inflammation chronique sans l'éradication des agents infectieuses. (Samson et al., 2011)

Le rôle principal de l'IL-17 secrétés par les Th17 dans la réponse anti-infectieuse est la stimulation et l'initiation de la granulopoïèse et le chimiotactisme des PNN. (Samson et al., 2011)

Les travaux ont montré l'implication des LTh17 dans plusieurs maladies inflammatoires et auto-immunes comme la sclérose en plaque, la maladie de Crohn, le rhumatisme palindromique, les maladies inflammatoires digestives et le psoriasis... (Samson et al., 2011; Tesmer et al., 2008; Wilson et al., 2007)

1.3. Lymphocyte T régulatrices (Treg)

1.3.1. Définition

Les cellules T régulatrices (Treg) sont des éléments centraux pour le maintien de l'homéostasie immunitaire et la tolérance immunologique avec des propriétés immunosuppressives puissantes. Ces cellules sont définies par une expression stable du facteur de transcription spécifique à la lignée 'Foxp3' et des quantités élevées de CD25+ (chaîne α du récepteur de l'IL-2). (Plitas and Rudensky, 2016)

1.3.2. Marqueurs

Les marqueurs exprimés par les Treg y compris CD25+, CD4+, CTLA-4 et le récepteur du facteur de nécrose tumorale induit par les glucocorticoïdes (GITR), sont hautement régulés de manière dépendante du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) lors de l'activation de ces lymphocytes. Plusieurs études ont permis d'identifier un marqueur spécifique de ces cellules et qui augmente leur capacité suppressive, c'est le Foxp3 (facteur de transcription de la famille forkhead), un membre codé par le chromosome X. Il agit comme un facteur essentiel de la spécification de lignée et la différenciation des Tregs (Fontenot et al., 2003; Hori, 2003). La mutation de perte de fonction de Foxp3 est responsable des maladies auto-immunes mortelles et toutes les manifestations cliniques de la déficience en Foxp3 sont dues au manque des Treg fonctionnels (Plitas and Rudensky, 2016).

1.3.3. Origine et épigénétique

La différenciation des Treg dérivées du thymus (tTreg), dépend d'une haute interaction de CMHII avec les complexes auto-peptides et la signalisation de récepteur d'IL2. Les tTreg sont responsables de la tolérance des auto-antigènes (Hsieh et al., 2006; Josefowicz et al., 2012). Cependant, Les Treg générés en dehors de thymus ou les Tregs périphériques (pTreg) principalement dans l'intestin se développent à partir de précurseurs des cellules T et nécessitent une stimulation antigénique tolérogènes, c'est-à-dire une costimulation optimale, une forte signalisation de TCR, des quantités de TGF- β et d'acide rétinoïque qui permettent l'induction de Foxp3 dans ces cellules périphériques. (Chen et al., 2003 ; Josefowicz et al., 2012 ; Plitas and Rudensky, 2016)

Le gène codant pour Foxp3 contient 4 régions importantes : le promoteur et trois régions non-codantes conservées : les CNS 1, 2 et 3 (Conserved Non-coding Sequences). Les CNS participent à la régulation de l'expression de Foxp3, de la fonction suppressive de Treg et la stabilité de la lignée. Les CNS2 et 3 sont impliqués dans la régulation des lymphocytes tTreg (CNS2 est lié à la stabilité de l'expression de Foxp3, CNS3 représente la région initiateur du processus de la différenciation des tTreg). CNS1, est indispensable pour une différenciation efficace des pTregs. (Zheng et al., 2010)

Les pTregs ne occupent que les réponses contre les antigènes de non-soi, telles que le microbiote commensal, les allergènes, les antigènes alimentaires dans les barrières intestinaux et les alloantigènes maternels. (Plitas and Rudensky, 2016)

La cartographie génétique montrant, le destin cellulaire a prouvé que la stabilité des Treg différenciés et le maintien de l'expression Foxp3 étaient héréditaires sous conditions inflammatoire et physiologique. Cependant, cette hérédité est assuré par CNS2 (Plitas and Rudensky, 2016; Rubtsov et al., 2010).

1.3.4. Rôles

La suppression immunitaire assurée par les Treg, est un mécanisme vital pour la régulation négative de l'inflammation et elle joue un rôle notable dans les troubles auto-inflammatoires ou auto-immuns, les allergies, les inflammations aiguës ou chroniques, et le cancer. Les Tregs occupent également une place importante dans l'inflammation métabolique et la réparation tissulaire. (Dauga et al., 1990, 1990; Nybo, 2009)

La manipulation thérapeutique des Tregs est une approche prometteuse. Elle est réalisée par l'augmentation de leur nombre et leur fonctionnalité dans les maladies inflammatoires, auto-immunes, et allergiques, tout en inhibant leurs mécanismes suppressifs ou en les appauvrissant dans le cancer. (Coombes et al., 2007)

1.4. La dichotomie et la différenciation des sous-population Treg et Th17

Les cellules Treg induites (iTreg) et les cellules Th17 sont dérivées d'une population d'un précurseur commun T conventionnel naïf (Tconv) chez la souris. Chez l'homme, les cellules Th17 peuvent provenir d'un sous-ensemble unique de CD161 dérivé du thymus. Les cellules iTreg et Th17 ont besoin de TGF β -1 pour leur développement, bien que la voie Th17 soit favorisée en présence d'IL-6. Le pool des cellules Treg périphériques (pTreg) est composé des cellules iTreg plus les cellules Treg « naturelles » (nTreg) dérivées du thymus. IL-2 et TGF β -1 peuvent tous les deux stabiliser l'expression de Foxp3, bien que certaines cellules Treg puissent finalement perdre la perdre. Le sort des cellules qui quittent le compartiment pTreg est inconnu. La dichotomie de Th17 et Treg permet de transdifférencier entre les sous-ensembles Th17 / Treg. (Alizadeh et al., 2013b; Eisenstein and Williams, 2009b). La nature

Et la concentration des cytokines présentes dans le milieu de différenciation conduisent à l'activation de cascades de signalisation distinctes et de facteurs de transcription qui contrôlent le programme de développement de ces lignées spécifiques. (Figure 1.6)

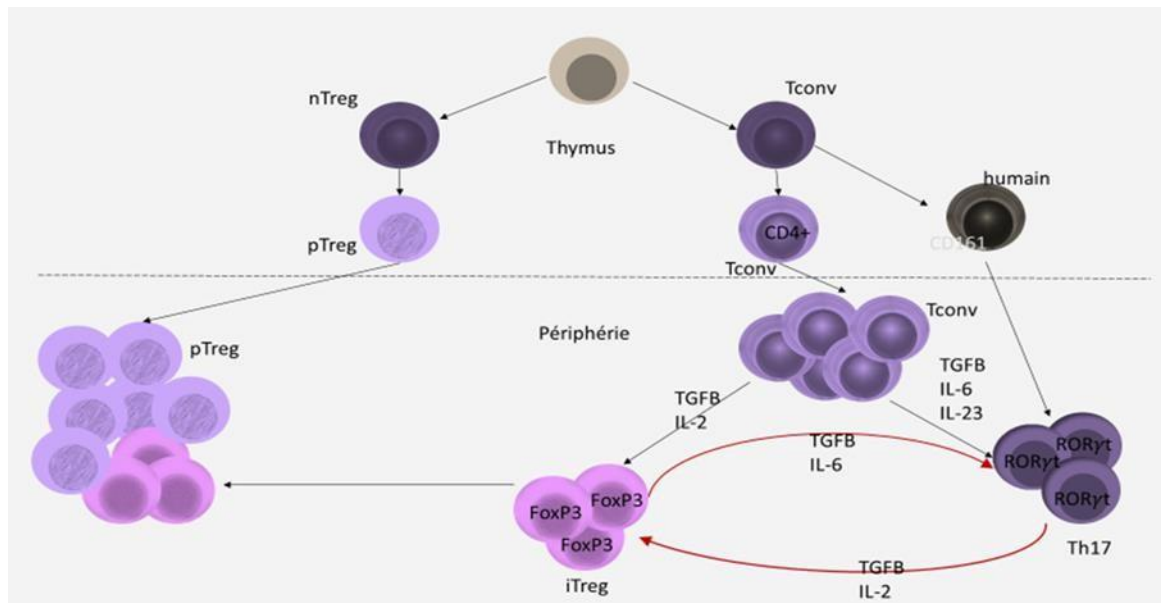


Figure 1.6. La dichotomie et la différenciation des sous-population Treg et Th17 (Alizadeh et al., 2013 ; Eisenstein and Williams, 2009).

1.4.1. La balance Treg / Th17

Les lymphocytes Th17 contrôlent la différenciation des Treg et vice versa, pour ainsi maintenir l'équilibre et combiner l'homéostasie immunitaire et l'élimination des pathogènes (Garrido-Mesa et al., 2013). Il y a une certaine dichotomie entre ces deux lignées qui pourraient nécessiter du TGFβ pour leur différenciation. Ce dernier induit l'expression de Foxp3 dans les lymphocytes T naïfs, favorisant le développement des Tregs, mais la présence d'IL-6 inhibe la génération de Tregs par l'induction de l'expression d'IL-23 R et de RORγt, favorisant le phénotype Th17 dans un processus qui semble dépendre de la dose des cytokines. L'expression de Foxp3 induite par TGF-β régule négativement la différenciation des lymphocytes Th17 en réprimant l'expression d'IL-23R et de RORγt (Garrido-Mesa et al., 2013). De plus, l'acide rétinoïque a été impliqué aussi dans l'équilibre Treg-Th17, il peut induire l'expression de Foxp3 et inhiber RORγt même dans des conditions induisant Th17, favorisant ainsi le développement de Tregs (Garrido-Mesa et al., 2013). L'équilibre entre les cellules Th17 et les cellules Treg est devenu un facteur important dans la régulation de plusieurs maladies et pour maintenir l'homéostasie. Les recherches démontrent que cet équilibre intervient dans le maintien d'un environnement immunitaire sain et fonctionnel.

Les cellules Th17 et Treg sont deux sous-ensembles de cellules T mutuellement contradictoires. Les cellules Th17 sont vitales pour la défense de l'hôte contre les agents pathogènes, mais elles sont également impliquées dans les troubles auto-immunes. Les Treg sont nécessaires pour l'auto-tolérance et la défense contre l'auto-immunité, mais sont souvent en corrélation avec la progression du cancer. (Knochelmann et al., 2018)

Des résultats suggèrent que la restauration d'un réseau de cytokines adéquat et d'un équilibre Th17 / Treg, peut aider à obtenir une meilleure réponse clinique dans le cas du cancer. L'inhibition de la fonction ROR γ offre une cible thérapeutique potentielle pour le traitement de troubles immunitaires tels que sclérose en plaques. (Duan et al., 2014)

Puisque le ROR γ t est le facteur indispensable pour la différenciation de la sous-population Th17 et également un influenceur de la dichotomie Th17/Treg. Le ciblage de leur gène pourrait être d'un rapport efficace dans le traitement des maladies correspondantes à médiation Th17.

1.5. PCR (Polymerase Chain Reaction)

1.5.1. Définition :

La PCR ou la réaction en chaîne par polymérase est une technique enzymatique découverte par le Dr Kary Mullis (1986), qui permet de détecter et de produire de grandes quantités d'ADN.

Les tests basés sur la PCR effectuent des études qualitatives et génomiques sophistiquées d'une manière sensible et rapide. La PCR est largement utile dans des domaines cliniques et dans les recherches scientifiques (diagnostic des maladies, séquençage, clonage des divers gènes et détection d'agents pathogènes). Elle est également utilisée en médecine légale. (Garibyan and Avashia, 2013a; Green and Sambrook, 2018)

La compréhension des principes de base de la PCR, son utilisation et son modification permet une analyse plus sophistiquée du génome et des gènes. (Garibyan and Avashia, 2013a; Green and Sambrook, 2018)

1.5.2. Principe :

La réaction enzymatique permet d'amplifier une séquence d'ADN à partir un fragment connu (20 nucléotides). Cette technique peut être effectuée par l'utilisation d'une variété des sources d'ADN (tissus, organismes, sang...). L'essentiel c'est de disposer de traces d'ADN pour une génération suffisante de copies à analyser, grâce la grande sensibilité de la technique. (Garibyan and Avashia, 2013a; Green and Sambrook, 2018)

1.5.3. Les acteurs :

La PCR nécessite la présence d'ADN matrice, des amorces, d'ADN polymérase et de nucléotides. La matrice est la région d'ADN (généralement double brin) qu'on veut amplifier.

Cette séquence d'acide nucléique, doit être suffisante et ne contienne aucun inhibiteur de la Taq polymérase. (Garibyan and Avashia, 2013; Green and Sambrook, 2018).

Les amorces sens et antisens sont des séquences courtes d'ADN (environ 20 bases) qui doivent être spécifiques et complémentaires à l'ADN à amplifier. Ces amorces permettent l'amplification d'ADN exacte et servent comme des point d'initiations sur lequel l'ADN polymérase va s'appuyer.

L'ADN polymérase (la taq polymérase : polymérase active à des températures élevées) est l'enzyme indispensable qui lie les nucléotides libres ensemble, pour générer le produit de la PCR. (Garibyan and Avashia, 2013a; Green and Sambrook, 2018)

Les nucléotides servent comme des blocs de construction et comprennent les bases : adénine, thymine, cytosine et guanine (A, T, C, G) qui se trouvent naturellement dans l'ADN. (Garibyan and Avashia, 2013a; Green and Sambrook, 2018)

1.5.4. Les étapes :

Les acteurs de la PCR sont mélangés dans une plaque à 96 puits ou un tube à essai, puis placés dans une machine (essentiellement un thermocycleur) qui permet la réalisation des cycles répétés (trois étapes de base) d'amplification d'ADN. Après l'insertion des échantillons, la machine abaisse et élève la température selon des étapes programmées et précises. (Garibyan and Avashia, 2013a; Green and Sambrook, 2018)

Chaque cycle d'ADN comprend trois étapes :

1. **La dénaturation** : la séparation des deux brins d'ADN par un chauffage (95°C).
2. **L'hybridation** : le collage des amorces aux extrémités de la séquence cible par la diminution de la température (40/65°C en fonction de la séquence des amorces).
3. **L'élongation** : des deux brins d'ADN à partir des amorces grâce à L'ADN polymérase (72°C : c'est la température optimale de la taq polymérase)

La durée d'un cycle est environ une minute qui se répéter un grand nombre de fois, pour l'amplification exponentielle de la séquence d'ADN choisi. Théoriquement n cycles de PCR permettent la production de 2^n copies de la séquence. (Garibyan and Avashia, 2013a; Green and Sambrook, 2018)

1.5.5. La visualisation :

Se fait principalement par deux méthodes :

1. Utilisation des colorants chimiques (tel que le bromure d'éthidium) pour la coloration de l'ADN amplifié.

2. Etiquetage par un fluorescent (fluorophores) des nucléotides ou des amorces avant l'amplification par PCR, qui sont incorporés directement dans le produit final.

L'analyse : La méthode la plus utilisée est l'utilisation de l'électrophorèse sur gel d'agarose, pour la séparation et la visualisation des produits de PCR en fonction de la taille et de la charge.

1.5.6. Les types :

- PCR qualitative (semi-quantitative) : est utilisée pour déceler l'absence ou la présence d'un produit d'ADN particulier, c'est une technique idéale pour le clonage ou pour l'identification d'un pathogène.
- PCR quantitative (en temps réel) : Il indique à la fois la détection et la quantité du produit de PCR en temps réel, pendant l'amplification. (Garibyan and Avashia, 2013b; Green and Sambrook, 2018; Heid et al., 1996)

1.6. Choix d'amorces

1.6.1. Définition

Le choix des amorces est essentiel, dans la mise au point de la réaction PCR. Ces oligonucléotides vont avoir les rôles suivants : l'hybridation à l'ADN matrice, la limitation de la région d'ADN à amplifier et grâce à leur extrémité 3'OH libre et elles initient le travail de l'ADN polymérase. (Dieffenbach et al., 1993)

1.6.2. Choix d'amorces de PCR

1.6.2.1. La spécificité

L'amorce doit être spécifique de l'espèce recherchée ou du gène, unique dans la matrice d'ADN à amplifier et elle ne doit pas s'hybrider avec un autre ADN contaminant.

La spécificité de l'amorce est importante surtout dans l'étude des familles multigéniques ou un transcrit alternatif défini.

1.6.2.2. Les outils

Des outils de la bio-informatique :

Ensembl : est un explorateur de génomes qui base sur la recherche génomique comparative, l'évolution, la variation de séquence et la régulation transcriptionnelle. Ensembl annote les gènes, calcule plusieurs alignements, prédit la fonction de régulation et recueille des données sur les maladies.

Primer-BLAST : est un outil pour trouver des amorces spécifiques à des modèle de PCR (en utilisant Primer3 et BLAST).

In-Silico PCR : est un outil utilisé pour vérifier la fiabilité des résultats, il compare la base de données des séquences avec une paire d'amorces PCR, en utilisant une stratégie d'indexation pour des performances très rapides.

1.6.2.3. Recherche de bonnes amorces :

L'amorce ou primer est une courte séquence d'ADN, servent comme points de départ de la PCR. Une bonne conception d'amorce est essentielle pour la réussite de cette opération, plusieurs conditions doivent être prises en considération lors de la conception des amorces pour une amplification spécifique avec un rendement élevé :

- La longueur ou la taille de l'amorce
- La température de fusion (T_m)
- La spécificité
- La complémentarité
- La teneur en G/C et le GC clamp

1.7. Problématique

La dichotomie Th17/Treg est importante pour maintenir l'homéostasie immunitaire. Les cellules Th17 sont vitales pour la défense de l'hôte, mais elles sont également impliquées dans les troubles auto-immuns. Bien que les Treg sont nécessaires pour l'auto-tolérance et la défense contre l'auto-immunité, ils peuvent aussi devenir délétères, puisqu'ils sont parfois en corrélation avec la progression du cancer. Une dominance de Th17 ou une surveillance dysfonctionnelle de Treg sont associées à des troubles immunitaires.

Le récepteur nucléaire ROR γ t qui est un facteur de transcription clé dans la génération et la différenciation de la sous-population Th17, et il permet également de contrôler la dichotomie Th17/Treg. Le ciblage de ROR γ t est efficace dans différents cas pathologiques et il constitue un chemin dans l'immunothérapie. Il est donc important de choisir les bonnes amorces pour l'étude d'expression du gène *RORC* dans les cellules Th17 et pour contrôler et moduler la dichotomie Th17/Treg.

Objectif : L'objectif de notre travail est la conception des amorces spécifiques qui encadrent le gène RORc de ROR γ t qui a été impliquée dans la dichotomie Th17/Treg, à l'aide des outils de bio-informatique.

But : Montrer que notre amorce spécifique peut servir à effectuer des analyses PCR pour exploiter la réponse Th17 soulignant une approche adoptive dans la modulation de la dichotomie Th17/Treg ou bien pour détecter les altérations qui touchent notre gène.

2. Chapitre 02. Matériels et méthodes

2.1. Conception des amorces pour la PCR

La conception des amorces est un processus crucial pour le succès global de la PCR, car sans la sélection des amorces fonctionnelles et optimales, on n'obtiendra pas le rendement souhaité de la PCR.

La conception d'amorce a deux objectifs principaux : l'efficacité de l'amplification et la spécificité.

Pour arriver à amplifier sélectivement des séquences nucléotidiques par PCR, il est important de confectionner au moins une paire d'oligonucléotides. Ces amorces sont synthétisées par voie chimique (les oligonucléotides dont l'extrémité 5'). (Álvarez-Fernández, 2013; Nybo, 2009; Tham and Moon, 1996)

2.2. Sélection des amorces

Les principales règles de sélection d'une amplification efficace de l'amorce et donc de la PCR sont définies ci-dessous :

2.2.1. La longueur de l'amorce

La spécificité et la température de fusion sont contrôlées par la longueur de l'amorce. Généralement l'utilisation d'amorces d'une longueur entre 18 et 24 bases avec une température d'hybridation optimale fournit la meilleure chance pour maintenir l'efficacité et la spécificité. Plus l'amorce est courte plus l'hybridation augmente.

2.2.2. La température de fusion (T_f)

Généralement elle se situe entre 56 et 62 °C.

Bien que les oligonucléotides soient ajoutés en même temps à une PCR dirigée sur une cible ou un site, les températures de fusion des amorces doivent être semblables, pour assurer une hybridation parfaite et pour éviter un mal amorcement. (Dauga et al., 1990)

Les températures de fusion des amorces sont déterminées à l'aide de calculs thermodynamiques avec la formule suivante :

$$T_f^{amorce} = \Delta H [\Delta S + R \ln (c/4)] - 273.15^\circ\text{C} + 16.6 \log_{10}[K^+]$$

H : l'enthalpie.

S : l'entropie pour la formation de l'hélice.

R : la constante molaire des gaz.

c : la concentration d'amorces.

- Pour les oligonucléotides de 18 à 24 bases on peut utiliser la formule suivante (formule de Wallace) :

$$T_f = 2(A+T) + 4(G+C)$$

A, T, G et C : les bases purine et pyrimidine.

- Tous simplement on peut utiliser des logiciels de conception d'amorces déjà disponibles sur l'internet. (Yang et al., 2006)

2.2.3. La spécificité

La spécificité de l'amorce dépend de la longueur de l'amorce, et ces amorces ne doivent amplifier que le gène ciblé. Puisque qu'il y a beaucoup plus des séquences uniques entre 15 et 24 paires de bases, l'amélioration de la spécificité est nécessaire.

Le choix d'une amorce incorrecte peut conduire à l'échec de la réaction PCR, avec mauvaise synthèse du gène, ou l'absence de synthèse du gène.

Pour la vérifier on peut réaliser un alignement local avec l'outil BLAST.

2.2.4. La complémentarité

Il est nécessaire d'éviter les régions d'homologie intra-amorce.

L'auto homologie de telle région, peut former des structures en « épingles à cheveux ».

L'homologie inter-amorce et l'homologie dans les régions centrales des amorces peuvent perturber l'hybridation avec la matrice.

L'homologie des extrémités 3' de l'une ou de l'autre amorce, cause la formation de dimères d'amorce, ce qui entraîne une compétition entre la formation du produit désiré et les dimères.

2.2.5. La teneur en G/C et les suites polypyrimidine (T, C) ou polypurine (A, G)

Le pourcentage de CG doit être entre 45-55 % pour que l'amorce ne soit pas fragile.

Les amorces avec des suites poly-G ou poly-C peuvent causer une hybridation non spécifique. Les suites poly-T et polyA doivent être évitées, par ce qu'elles ouvriront des parties du complexe amorce-matrice. L'utilisation des suites polypyrimidine (T, C) et polypurine (A, G) peut réduire l'efficacité de l'amplification.

Il est préférable d'utiliser des amorces avec les successions de bases mélangées.

2.2.6. La séquence à l'extrémité 3

Pour éviter le problème des homologies d'amorce qui se produit dans les régions 3', le mal amorçage et la respiration, il faut choisir un résidu G ou C à l'extrémité 3' des amorces car la liaison C/G est plus forte que la liaison A/T.

2.3. RORC et RORyt

Le gène *RORC* est un membre de la superfamille des gènes des récepteurs nucléaires ROR.

RORyt (*RORC* variant 2), est un facteur de transcription de la signature des cellules Th17, il est codé par le gène *RORC*, et qui est un membre des récepteurs nucléaires orphelins NR1F.

Le RORyt est exprimé comme 1 des 2 isoformes d'ARNm transcrites à partir de promoteurs alternatifs dans le gène *RORC* et code pour une protéine qui est plus courte de 21 acides aminés N-terminaux et il diffère dans les 3 premiers acides aminés N-terminaux par rapport à l'isoforme principale RORγ. (Ratajewski et al., 2016)

2.4. La séquence du gène *RORC*

- On a recherché la séquence du gène *RORC* par l'utilisation de la base de données « ENSEMBL » avec le site « www.ensembl.org ». (Figures ci-dessous)

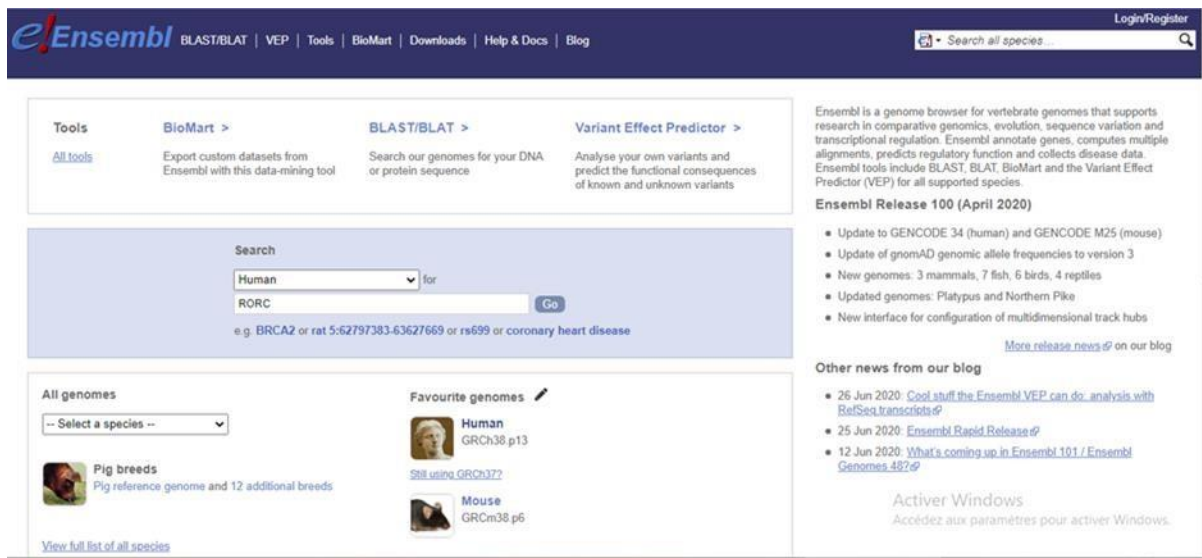


Figure 2.1 : La base de données “Ensembl”.

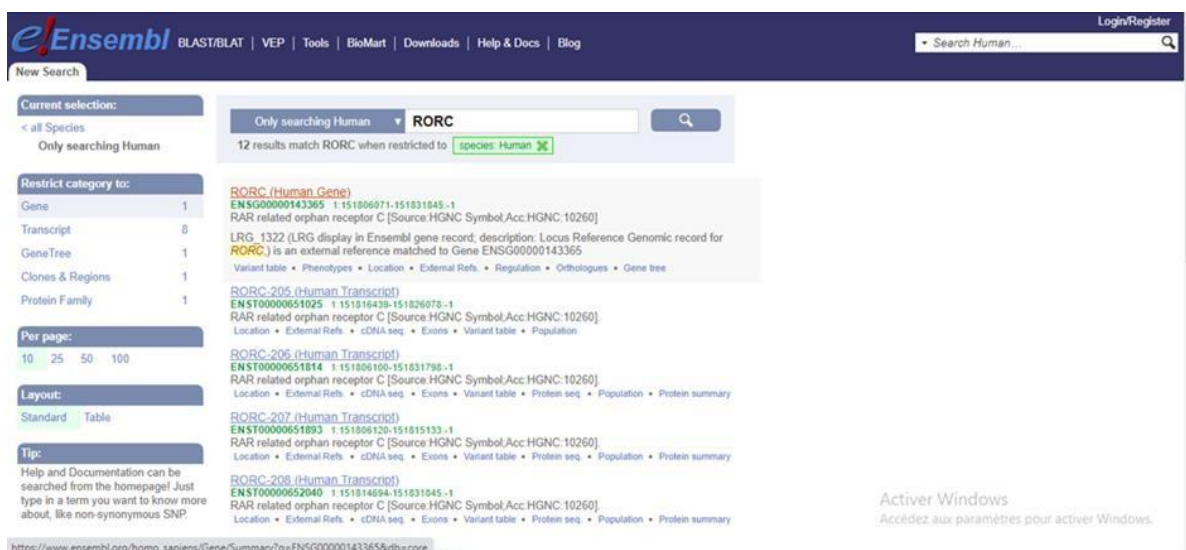


Figure 2.2: La recherche de notre gène exact *RORC*.

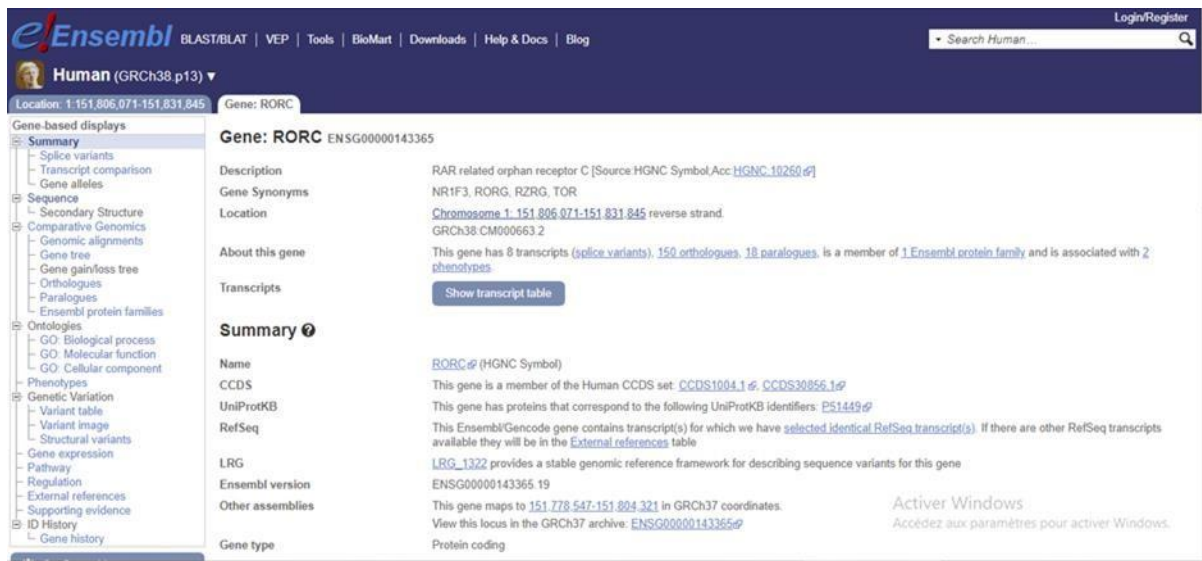


Figure 2.3: La description du gène *RORC*.

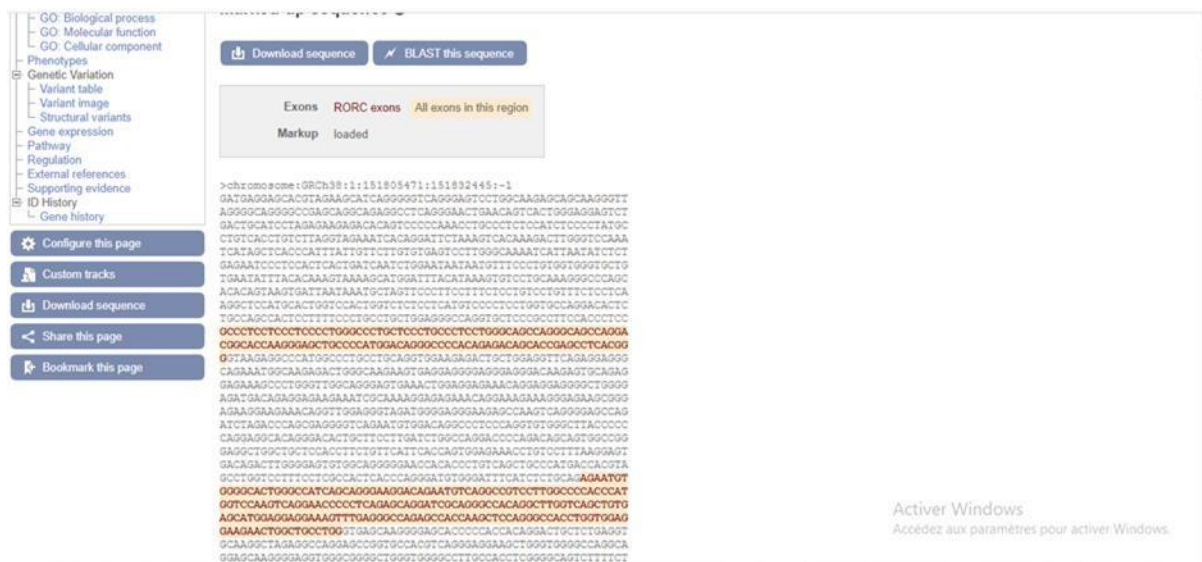


Figure 2.4: La séquence de gène *RORC*.

- Après cela, on a obtenu la séquence du gène *RORC* qui contient 10 introns et 9 exons, on l'a copié et l'a collé dans un document Word, puis nous avons choisi et mis exon 4 dans un cadre. L'exon 4 est le seul qui a une longueur moyenne et il a un seul produit spécifique.

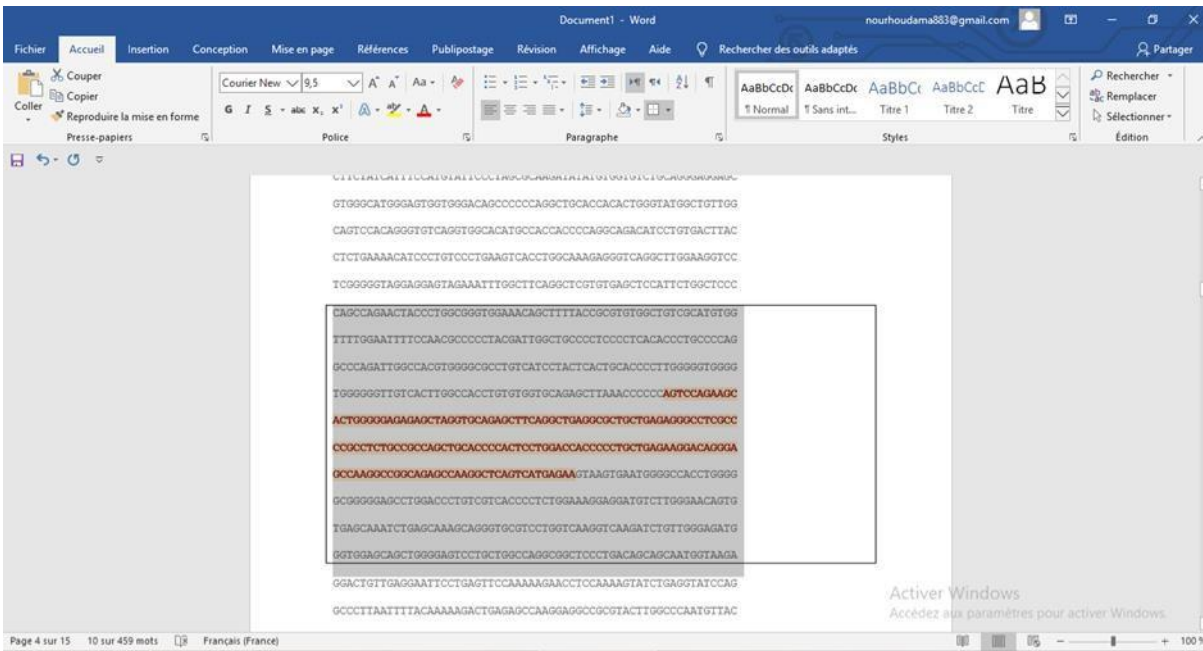


Figure 2.5 : L'exon 4 encadrée.

2.5. Le design de primer

- À l'aide de la plateforme : centre national américain de l'information biotechnologique (NCBI) et par l'utilisation du logiciel Primer blaste sur le site « www. Ncbi. nlm. nih. Gov » on a conçu l'amorce spécifique du gène *RORC*.

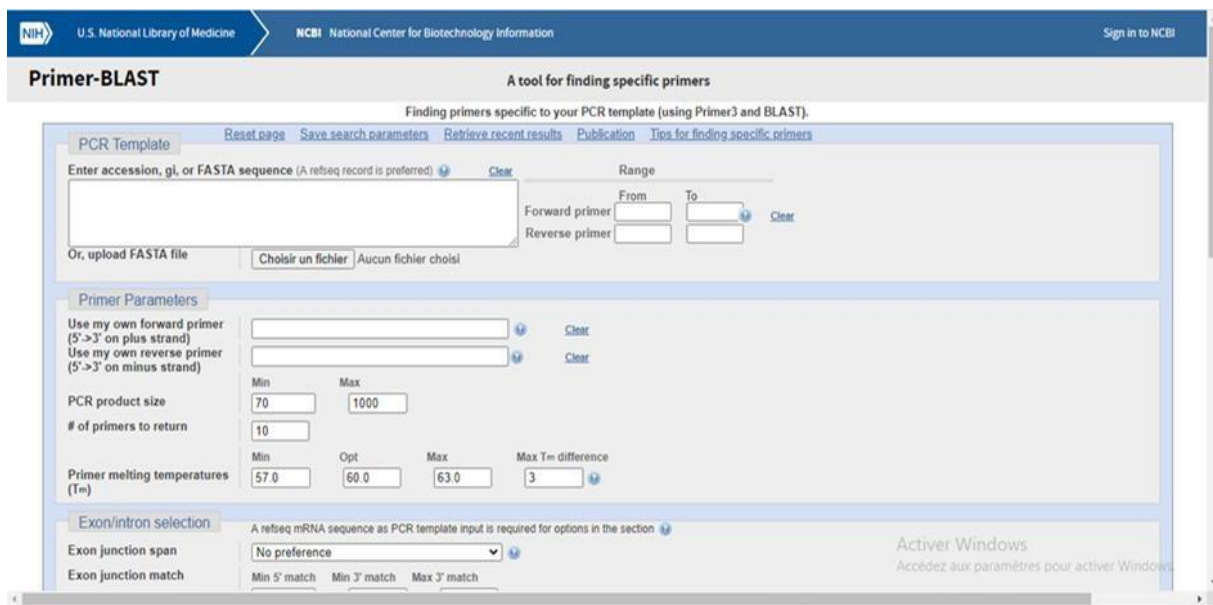


Figure 2.6 : L'outil Primer BLAST

- Pour remplir les cases des amorces sens, on sélectionne du début de la séquence encadrée jusqu'au début de l'exon 4, puis on clique sur réversion, ensuit sur option statistique, on obtient une fenêtre

contenant les numéros à remplir et pour déterminer les cases de l'autre amorce anti sens, on sélectionne du début de la séquence encadrée jusqu'au la fin de l'exon 4.

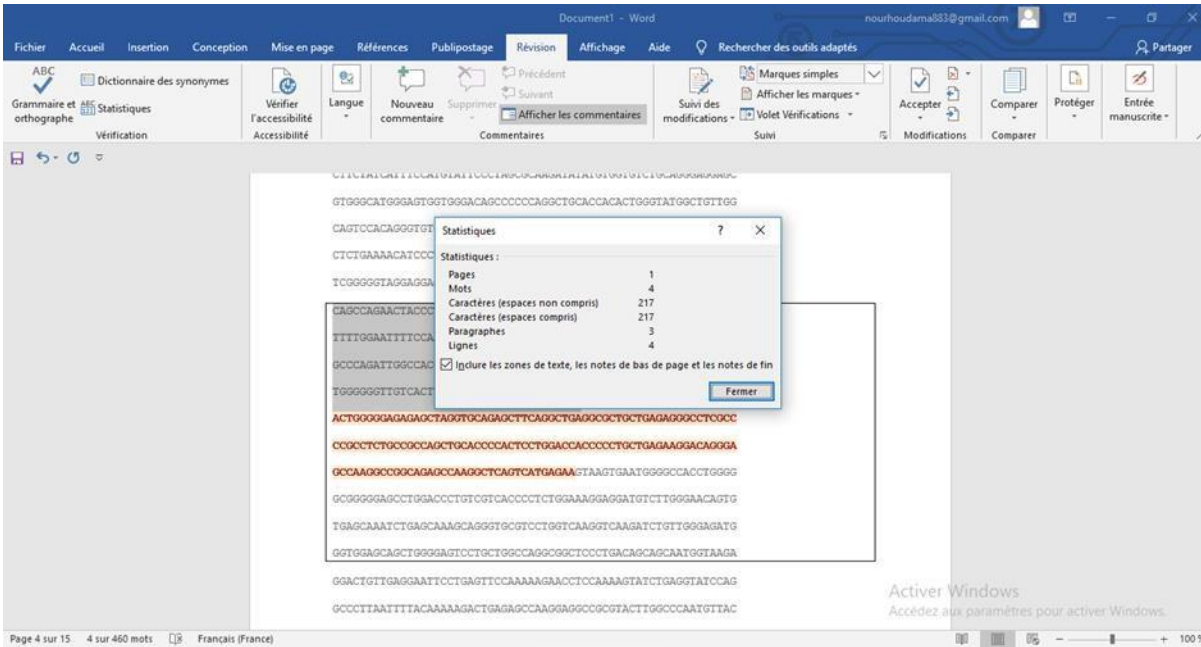


Figure 2.7 : La numération des bases.

- Ensuite, on a copié et collé notre amorce d'intérêt (exon 4) dans le primer BLAST, supprimé les espaces indésirables entre les nucléotides et déterminer la séquence de l'amorce sens et anti sens.

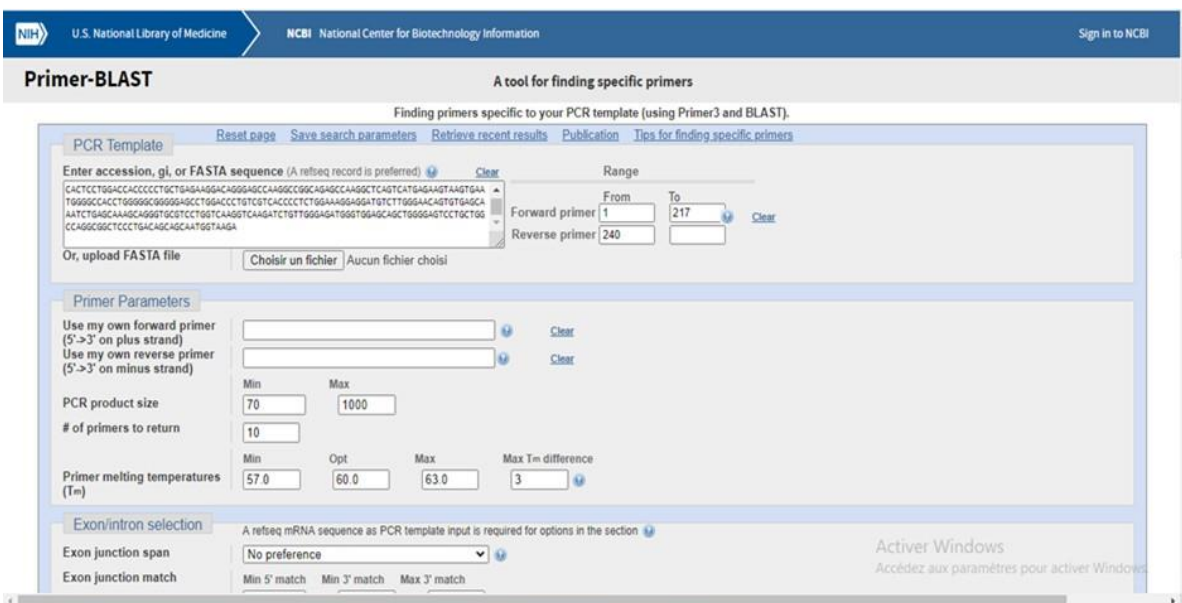


Figure 2.8 : Analyse de la séquence d'intérêt par le Primer blast.

Par la suite, nous sommes passés à la clé « Database » où nous avons choisi « Genomes for selectes organisme (primer reference assembly only) ». Et à la fin nous avons cliqué sur le bouton "Get Primers" et « show results in a new window », ci-dessous pour voir les résultats dans une nouvelle fenêtre (Figures ci-dessous).

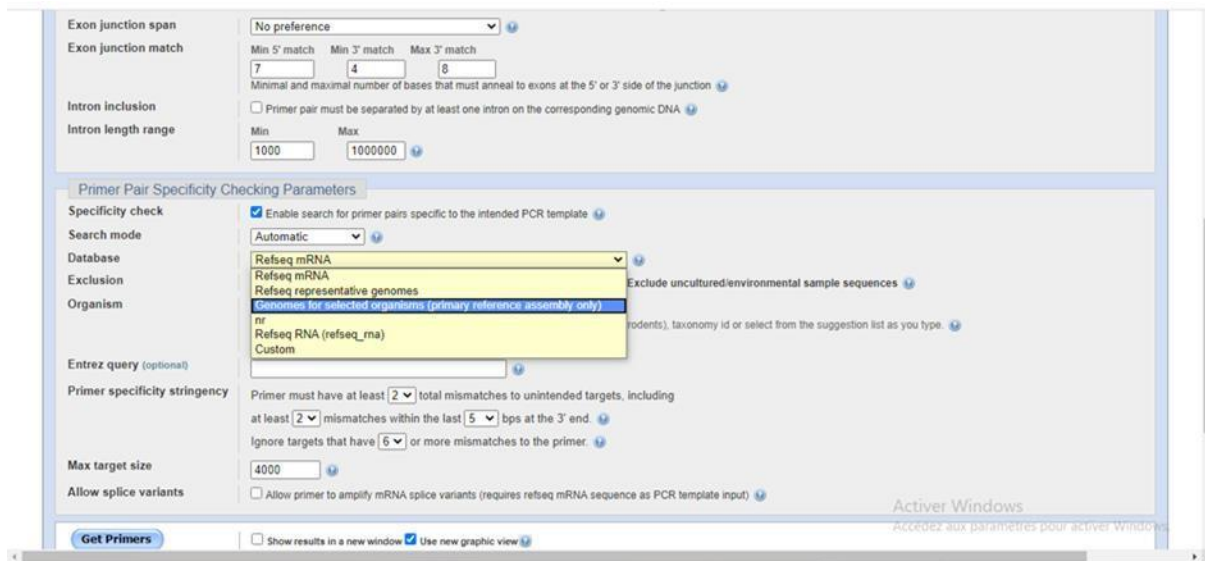


Figure 2.9 : l'obtention des résultats à travers le primer blast

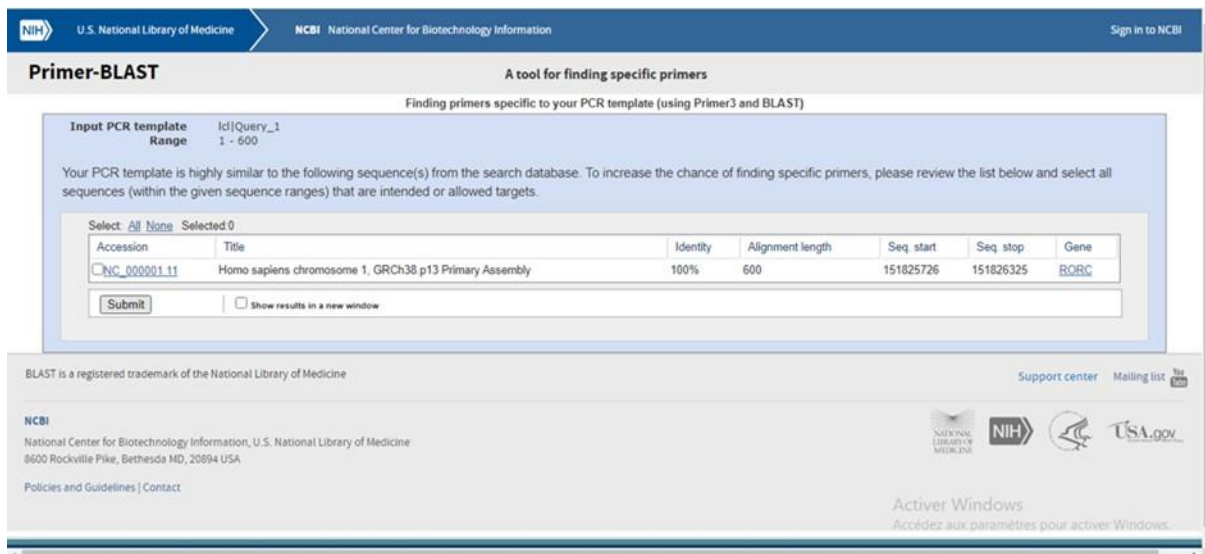


Figure 2.10 : La confirmation de notre gène.

2.6. Les caractéristiques d'une bonne paire d'amorce

- La longueur du produit résultant de l'amorce spécifique faudrait qu'elle contienne un nombre de bases inférieur à 1000 bases, car la PCR n'amplifie pas une séquence comportant plus de 1000 bases.
- La teneur en GC doit être proche de 50%.
- Les températures d'hybridation des amorces sens et anti sens doivent être équivalente des unes aux autres, car 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.

G-D Chapitre 03 : Résultats

1. Résultats de primer blast

Les résultats obtenus à partir de ce processus sont présentées ci-dessous :

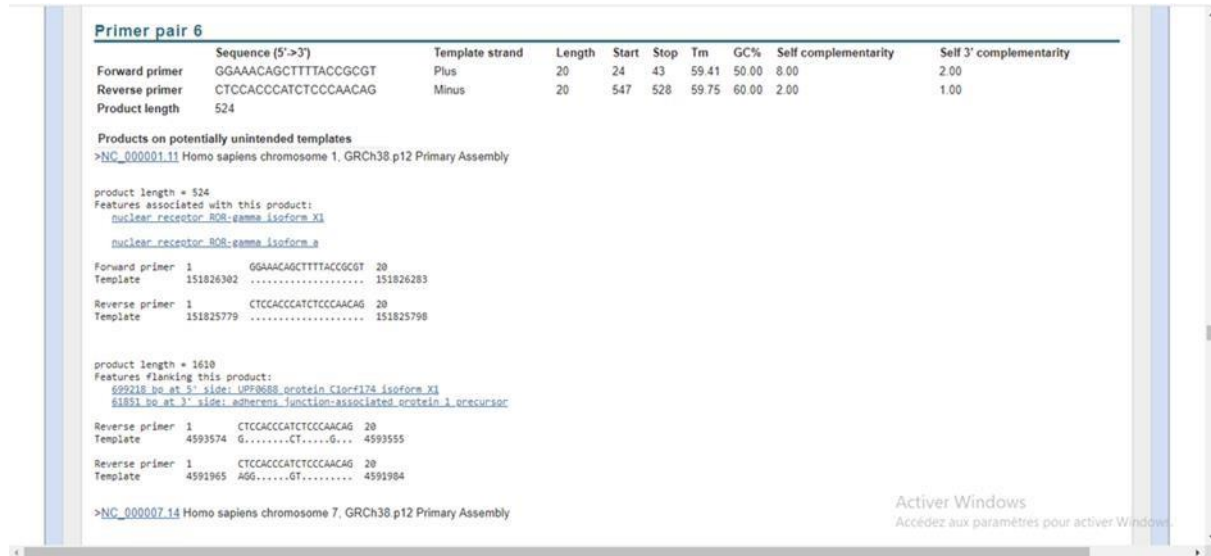


Figure 3.1 : Résultat de primer BLAST

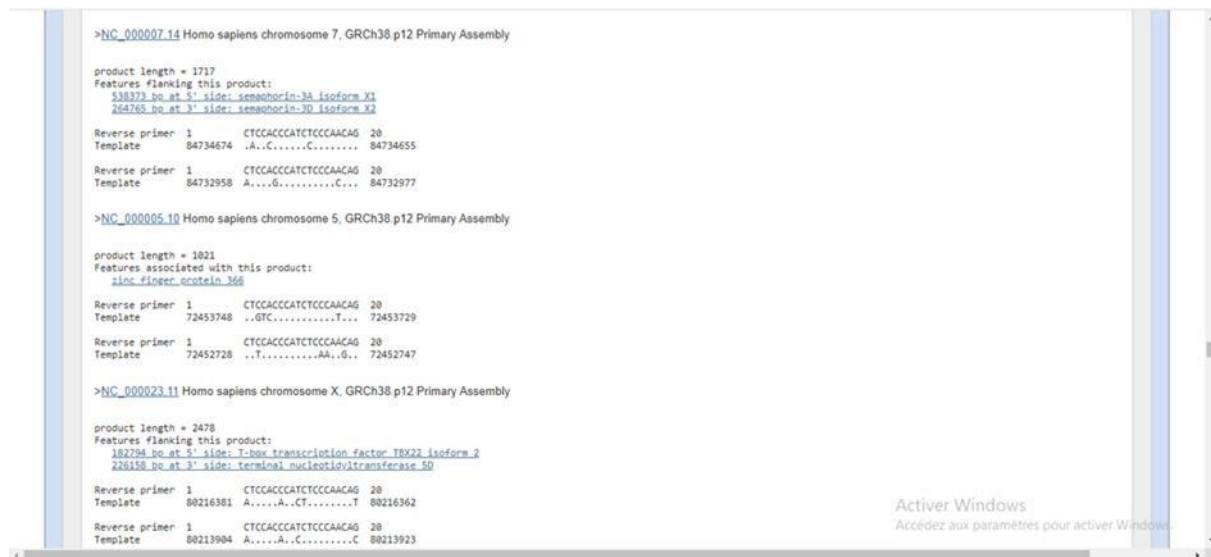


Figure 3.2 : Résultat 2 de primer BLAST

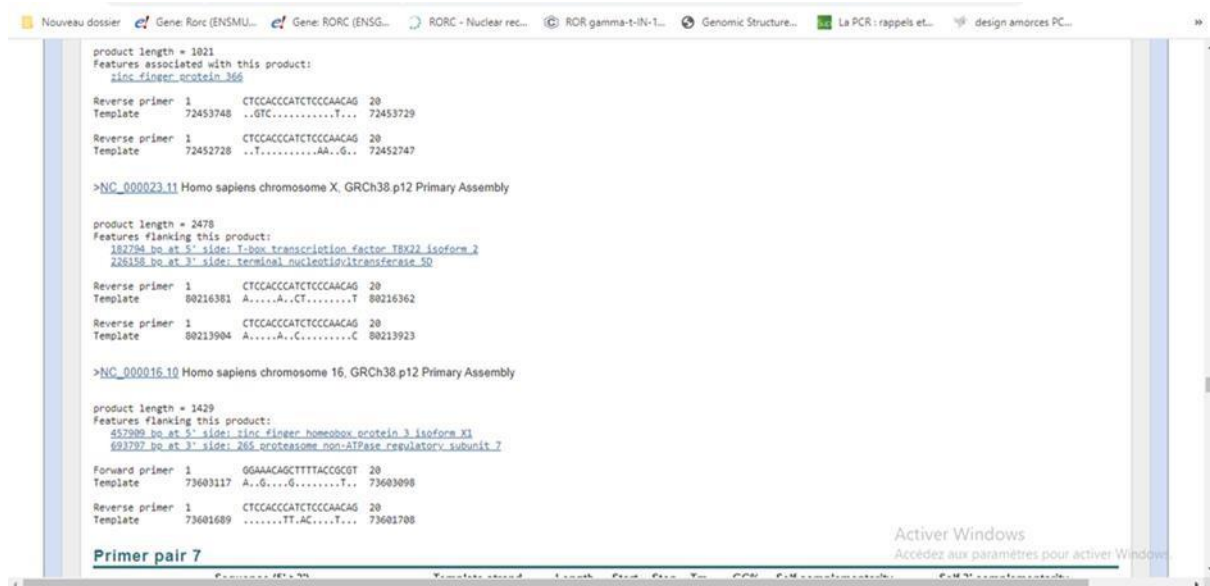


Figure 3.3 : Résultat 3 de primer BLAST

2. Interprétation des résultats

- 2.1. Le site Ensembl décrit l'intégrité du gène *RORC* qui contient 9 exons.
- 2.2. Le site Primer blast nous a permis de choisir l'exon 4 pour obtenir l'amorce spécifique du gène *RORC*.
- 2.3. De plus, nous avons obtenu 10 paires d'amorces spécifiques du gène *RORC* (exon 4) par l'utilisation du programme primer blast.

Enfin, on a choisi la paire d'amorce "6" grâce à la présence des critères exigés précédemment :

Tableau 01 : résultats de la conception

Critères d'une bonne amorce	Taux optimal	Notre amorces
Température de fusion	52 à 60 °C	Directe (59.41 °C) Inverse (59.75 °C)
Longueur	15 à 30 nucléotides	Directe 20 nucléotides Inverse 20 nucléotides
Teneur en CG	40 à 60%	Directe 50% Inverse 60%
Produits spécifique	Moins de 1000 pb	524 pb
Produits aspécifiques	Plus de 1000 pb	Tous plus de 1000 pb

3. Confirmation des résultats

La dernière étape de notre travail est de confirmer les résultats, qui se fait par le logiciel « PCR In Silicon » via le site (<https://genome.ucsc.edu/>) qui nous a donné l'emplacement de notre produit spécifique sur le chromosome 1 avec le locus exact et grâce à cela nous avons prouvé la spécificité de ces amorces.

Figure 3.4 : Confirmation de fiabilité des résultats par le logiciel PCR In Silico

4. Perspectives :

Il a été démontré que l'isoforme ROR γ t, joue un rôle critique dans la différenciation des cellules Th17. Donc, il est clair que le ciblage de gène ROR γ t dans la dichotomie Th17 / Treg, est efficace pour le traitement des troubles immunitaires à médiation Th17, avec la minimisation des effets secondaires cliniques des immunosuppresseurs utilisés.

On aimerait cibler, sélectivement le ROR γ t pour l'utiliser dans les futures études d'immunothérapie des maladies auto-immunes et de déséquilibre Th17 / Treg. Ce qui rend probablement la modulation sélective de ROR γ t peuvent être développés indépendamment des autres facteurs.

Dans perspectives le ciblage pourrait être par plusieurs façons, comme le transfert des sondes activateurs ou répresseurs fourniront un moyen de disséquer complètement la biologie des isoformes ROR, ou bien par des vaccins.

Ces résultats ouvrent la porte pour fournir de nouvelles informations sur la puissance des cellules Th17 dans la régression des tumeurs, améliorant ainsi notre capacité à maîtriser le système immunitaire.

En effet le domaine de l'immunothérapie anticancéreuse, converge sur le potentiel d'exploiter la dichotomie Th17 / Treg, pour avoir un impact profond sur la vie des patients atteints de cancer et d'auto-immunité sans perturber les réponses des autres cellules.

Conclusion

La PCR est une technique incontournable et très couramment utilisée dans nombreux domaines : en routine des laboratoires, en médecine, en recherche fondamentale, en médecine légale, en agroalimentaire et en histoire. Cette réaction enzymatique permet de sélectionner puis d'amplifier en une très grande quantité un fragment d'ADN particulier, présent en très faible quantité au départ, parmi des millions d'autres fragments.

La conception des amorces est un processus crucial pour le succès global de la PCR, car sans la sélection des amorces fonctionnelles et optimales, on n'obtiendra pas le rendement souhaité de la PCR.

Dans la présente étude, nous avons conçue des amorces pour l'analyse du gène *RORC*, un gène dont le produit est impliqué dans la dichotomie Th17/Treg, l'équilibre entre ces deux lymphocytes est devenu un facteur important dans la régulation de plusieurs maladies et pour le maintenir l'homéostasie immunitaire.

L'étude de la variation génétique au niveau de ce gène, consiste à utiliser des amorces afin d'amplifier une région encadrant la variation, ceci représente une étape préalable, et indispensable à toute analyse de biologie moléculaire impliquant ce gène (PCR/Séquençage, RT/PCR ...).

Nous avons élaboré ce travail, grâce aux outils de la bio-informatique qui nous a permis de choisir l'exon 4 du gène *RORC*, pour obtenir la paire d'amorce "6" spécifique. Cette paire d'amorce répond aux critères exigés internationalement (Température de fusion : 59°C, longueur : 20 nucléotides, produits spécifiques : 524 pb, produits aspécifiques : tous plus de 1000 pb).

Notre paire d'amorce encadre spécifiquement du gène *RORC* associé au dérèglement immunitaire qui est considéré comme préfigurant de plusieurs maladies graves tel que le cancer et les maladies auto-immunes.

De ce fait, Il est important de bien concevoir les amorces avant toute manipulation ultérieure concernant les études sur les altérations qui peuvent toucher notre gène. Pour cela il existe plusieurs outils de la bio-informatique qui permettent de retrouver les séquences de référence de n'importe quel gène et de concevoir des amorces spécifiques.

Références bibliographies :

A

- Alizadeh, D., Katsanis, E., Larmonier, N., 2013a. The Multifaceted Role of Th17 Lymphocytes and Their Associated Cytokines in Cancer. *Clin. Dev. Immunol.* 2013, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2013/957878>
- Alizadeh, D., Katsanis, E., Larmonier, N., 2013b. The Multifaceted Role of Th17 Lymphocytes and Their Associated Cytokines in Cancer. *Clin. Dev. Immunol.* 2013, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2013/957878>
- Álvarez-Fernández, R., 2013. Explanatory Chapter, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 1–21. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00001-X>
- André, E., Gawlas, K., Steinmayr, M., Becker-André, M., 1998. A novel isoform of the orphan nuclear receptor ROR β is specifically expressed in pineal gland and retina. *Gene* 216, 277–283. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(98\)00348-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(98)00348-5)

B

- Bain, D.L., Heneghan, A.F., Connaghan-Jones, K.D., Miura, M.T., 2007. Nuclear Receptor Structure: Implications for Function. *Annu. Rev. Physiol.* 69, 201–220. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.031905.160308>
- Batten, M., Li, J., Yi, S., Kljavin, N.M., Danilenko, D.M., Lucas, S., Lee, J., de Sauvage, F.J., Ghilardi, N., 2006. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17–producing T cells. *Nat. Immunol.* 7, 929–936. <https://doi.org/10.1038/ni1375>

C

- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., Wahl, S.M., 2003. Conversion of Peripheral CD4+CD25– Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. *J. Exp. Med.* 198, 1875–1886. <https://doi.org/10.1084/jem.20030152>
- Coombes, J.L., Siddiqui, K.R.R., Arancibia-Cárcamo, C.V., Hall, J., Sun, C.-M., Belkaid, Y., Powrie, F., 2007. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF- β – and retinoic acid–dependent mechanism. *J. Exp. Med.* 204, 1757–1764. <https://doi.org/10.1084/jem.20070590>

D

- Dauga, C., Grimont, F., Grimont, P.A.D., 1990. Nucleotide sequences of 16S rRNA from ten *Serratia* species. *Res. Microbiol.* 141, 1139–1149. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(90\)90087-7](https://doi.org/10.1016/0923-2508(90)90087-7)
- Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M., Dveksler, G.S., 1993. General concepts for PCR primer design. *Genome Res.* 3, S30–S37. <https://doi.org/10.1101/gr.3.3.S30>
- Duan, M.-C., Zhong, X.-N., Liu, G.-N., Wei, J.-R., 2014. The Treg/Th17 Paradigm in Lung Cancer. *J. Immunol. Res.* 2014, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/730380>

E

- Eberl, G., Littman, D.R., 2003. The role of the nuclear hormone receptor ROR γ t in the development of lymph nodes and Peyer's patches: Eberl & Littman γ t in lymphoid organ development. *Immunol. Rev.* 195, 81–90. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2003.00074.x>
- Eberl, G., Marmon, S., Sunshine, M.-J., Rennert, P.D., Choi, Y., Littman, D.R., 2004. An essential function for the nuclear receptor ROR γ t in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells. *Nat. Immunol.* 5, 64–73. <https://doi.org/10.1038/ni1022>
- Eisenstein, E.M., Williams, C.B., 2009a. The Treg/Th17 Cell Balance: A New Paradigm for Autoimmunity. *Pediatr. Res.* 65, 26R–31R. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31819e76c7>

Eisenstein, E.M., Williams, C.B., 2009b. The Treg/Th17 Cell Balance: A New Paradigm for Autoimmunity. *Pediatr. Res.* 65, 26R-31R.
<https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31819e76c7>

F

Fontenot, J.D., Gavin, M.A., Rudensky, A.Y., 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4, 330–336.
<https://doi.org/10.1038/ni904>

G

Garibyan, L., Avashia, N., 2013a. Polymerase Chain Reaction. *J. Invest. Dermatol.* 133, 1–4.
<https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>

Garibyan, L., Avashia, N., 2013b. Polymerase Chain Reaction. *J. Invest. Dermatol.* 133, 1–4.
<https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>

Garrido-Mesa, N., Algieri, F., Rodríguez Nogales, A., Gálvez, J., 2013. Functional Plasticity of Th17 Cells: Implications in Gastrointestinal Tract Function. *Int. Rev. Immunol.* 32, 493–510. <https://doi.org/10.3109/08830185.2013.834899>

Giguère, V., McBroom, L.D., Flock, G., 1995. Determinants of target gene specificity for ROR alpha 1: monomeric DNA binding by an orphan nuclear receptor. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2517–2526. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.5.2517>

Giguere, V., Tini, M., Flock, G., Ong, E., Evans, R.M., Otulakowski, G., 1994. Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR alpha, a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev.* 8, 538–553.
<https://doi.org/10.1101/gad.8.5.538>

Green, M.R., Sambrook, J., 2018. The Basic Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb. Protoc.* 2018, pdb.prot095117. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095117>

H

Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M., 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6, 986–994. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>

Hori, S., 2003. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science* 299, 1057–1061. <https://doi.org/10.1126/science.1079490>

Hsieh, C.-S., Zheng, Y., Liang, Y., Fontenot, J.D., Rudensky, A.Y., 2006. An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat. Immunol.* 7, 401–410. <https://doi.org/10.1038/ni1318>

Hu, X., Wang, Y., Hao, L.-Y., Liu, X., Lesch, C.A., Sanchez, B.M., Wendling, J.M., Morgan, R.W., Aicher, T.D., Carter, L.L., Toogood, P.L., Glick, G.D., 2015. Sterol metabolism controls TH17 differentiation by generating endogenous ROR γ agonists. *Nat. Chem. Biol.* 11, 141–147. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1714>

Hwang, E.S., 2010. Transcriptional Regulation of T Helper 17 Cell Differentiation. *Yonsei Med. J.* 51, 484. <https://doi.org/10.3349/ymj.2010.51.4.484>

I

Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., Littman, D.R., 2006. The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. *Cell* 126, 1121–1133.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.035>

J

Jetten, A.M., 2009a. Retinoid-Related Orphan Receptors (RORs): Critical Roles in Development, Immunity, Circadian Rhythm, and Cellular Metabolism. *Nucl. Recept. Signal.* 7, nrs.07003. <https://doi.org/10.1621/nrs.07003>

- Jetten, A.M., 2009b. Retinoid-Related Orphan Receptors (RORs): Critical Roles in Development, Immunity, Circadian Rhythm, and Cellular Metabolism. *Nucl. Recept. Signal.* 7, nrs.07003. <https://doi.org/10.1621/nrs.07003>
- Jetten, A.M., Joo, J.H., 2006. Retinoid-related orphan receptors (RORs): Roles in cellular differentiation and development, in: *Advances in Developmental Biology*. Elsevier, pp. 313–355. [https://doi.org/10.1016/S1574-3349\(06\)16010-X](https://doi.org/10.1016/S1574-3349(06)16010-X)
- Jin, L., Martynowski, D., Zheng, S., Wada, T., Xie, W., Li, Y., 2010. Structural Basis for Hydroxycholesterols as Natural Ligands of Orphan Nuclear Receptor ROR γ . *Mol. Endocrinol.* 24, 923–929. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0507>
- Josefowicz, S.Z., Lu, L.-F., Rudensky, A.Y., 2012. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 531–564. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623>

K

- Kallen, J., Schlaeppli, J.-M., Bitsch, F., Delhon, I., Fournier, B., 2004. Crystal Structure of the Human ROR α Ligand Binding Domain in Complex with Cholesterol Sulfate at 2.2 Å. *J. Biol. Chem.* 279, 14033–14038. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400302200>
- Kallen, J.A., Schlaeppli, J.-M., Bitsch, F., Geisse, S., Geiser, M., Delhon, I., Fournier, B., 2002. X-Ray Structure of the hROR α LBD at 1.63 Å. *Structure* 10, 1697–1707. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(02\)00912-7](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(02)00912-7)
- Knochelmann, H.M., Dwyer, C.J., Bailey, S.R., Amaya, S.M., Elston, D.M., Mazza-McCrann, J.M., Paulos, C.M., 2018. When worlds collide: Th17 and Treg cells in cancer and autoimmunity. *Cell. Mol. Immunol.* 15, 458–469. <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0004-4>

L

- Lee, G., 2018. The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 730. <https://doi.org/10.3390/ijms19030730>
- LeibundGut-Landmann, S., Groß, O., Robinson, M.J., Osorio, F., Slack, E.C., Tsoni, S.V., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Brown, G.D., Ruland, J., Reis e Sousa, C., 2007. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat. Immunol.* 8, 630–638. <https://doi.org/10.1038/ni1460>

M

- Ma, C.S., Chew, G.Y.J., Simpson, N., Priyadarshi, A., Wong, M., Grimbacher, B., Fulcher, D.A., Tangye, S.G., Cook, M.C., 2008. Deficiency of Th17 cells in hyper IgE syndrome due to mutations in STAT3. *J. Exp. Med.* 205, 1551–1557. <https://doi.org/10.1084/jem.20080218>
- Medvedev, A., Chistokhina, A., Hirose, T., Jetten, A.M., 1997. Genomic Structure and Chromosomal Mapping of the Nuclear Orphan Receptor ROR γ (RORC) Gene. *Genomics* 46, 93–102. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.4980>
- Medvedev, A., Yan, Z.-H., Hirose, T., Giguère, V., Jetten, A.M., 1996. Cloning of a cDNA encoding the murine orphan receptor RZR/ROR γ and characterization of its response element. *Gene* 181, 199–206. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(96\)00504-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00504-5)
- Miossec, P., 2007. Interleukin-17 in fashion, at last: Ten years after its description, its cellular source has been identified. *Arthritis Rheum.* 56, 2111–2115. <https://doi.org/10.1002/art.22733>

N

- Nybo, K., 2009. DNA and General PCR Methods: PCR Primer Design. *BioTechniques* 46, 505–507. <https://doi.org/10.2144/000113179>

O

- Okada, S., Markle, J.G., Deenick, E.K., Mele, F., Averbuch, D., Lagos, M., Alzahrani, M., Al-Muhsen, S., Halwani, R., Ma, C.S., Wong, N., Soudais, C., Henderson, L.A.,

Marzouqa, H., Shamma, J., Gonzalez, M., Martinez-Barricarte, R., Okada, C., Avery, D.T., Latorre, D., Deswarte, C., Jabot-Hanin, F., Torrado, E., Fountain, J., Belkadi, A., Itan, Y., Boisson, B., Migaud, M., Arlehamn, C.S.L., Sette, A., Breton, S., McCluskey, J., Rossjohn, J., de Villartay, J.-P., Moshous, D., Hambleton, S., Latour, S., Arkwright, P.D., Picard, C., Lantz, O., Engelhard, D., Kobayashi, M., Abel, L., Cooper, A.M., Notarangelo, L.D., Boisson-Dupuis, S., Puel, A., Sallusto, F., Bustamante, J., Tangye, S.G., Casanova, J.-L., 2015. Impairment of immunity to *Candida* and *Mycobacterium* in humans with bi-allelic RORC mutations. *Science* 349, 606–613. <https://doi.org/10.1126/science.aaa4282>

P

Plitas, G., Rudensky, A.Y., 2016. Regulatory T Cells: Differentiation and Function. *Cancer Immunol. Res.* 4, 721–725. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0193>

R

Ratajewski, M., Walczak-Drzewiecka, A., Gorzkiewicz, M., Sałkowska, A., Dastych, J., 2016. Expression of human gene coding ROR γ T receptor depends on the Sp2 transcription factor. *J. Leukoc. Biol.* 100, 1213–1223. <https://doi.org/10.1189/jlb.6A0515-212RR>

Rubtsov, Y.P., Niec, R.E., Josefowicz, S., Li, L., Darce, J., Mathis, D., Benoist, C., Rudensky, A.Y., 2010. Stability of the Regulatory T Cell Lineage in Vivo. *Science* 329, 1667–1671. <https://doi.org/10.1126/science.1191996>

Rutz, S., Eidenschenk, C., Kiefer, J.R., Ouyang, W., 2016. Post-translational regulation of ROR γ t—A therapeutic target for the modulation of interleukin-17-mediated responses in autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 30, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2016.07.004>

S

Samson, M., Lakomy, D., Audia, S., Bonnotte, B., 2011. Les lymphocytes TH17 : différenciation, phénotype, fonctions, et implications en pathologie et thérapeutique humaine. *Rev. Médecine Interne* 32, 292–301. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2009.12.020>

Santori, F.R., Huang, P., van de Pavert, S.A., Douglass, E.F., Leaver, D.J., Haubrich, B.A., Keber, R., Lorbek, G., Konijn, T., Rosales, B.N., Rozman, D., Horvat, S., Rahier, A., Mebius, R.E., Rastinejad, F., Nes, W.D., Littman, D.R., 2015. Identification of Natural ROR γ Ligands that Regulate the Development of Lymphoid Cells. *Cell Metab.* 21, 286–298. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.01.004>

Stehlin-Gaon, C., Willmann, D., Zeyer, D., Sanglier, S., Van Dorsselaer, A., Renaud, J.-P., Moras, D., Schüle, R., 2003. All-trans retinoic acid is a ligand for the orphan nuclear receptor ROR β . *Nat. Struct. Mol. Biol.* 10, 820–825. <https://doi.org/10.1038/nsb979>

Stumhofer, J.S., Laurence, A., Wilson, E.H., Huang, E., Tato, C.M., Johnson, L.M., Villarino, A.V., Huang, Q., Yoshimura, A., Sehy, D., Saris, C.J.M., O’Shea, J.J., Hennighausen, L., Ernst, M., Hunter, C.A., 2006. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17–producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat. Immunol.* 7, 937–945. <https://doi.org/10.1038/ni1376>

T

Tesmer, L.A., Lundy, S.K., Sarkar, S., Fox, D.A., 2008. Th17 cells in human disease. *Immunol. Rev.* 223, 87–113. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00628.x>

Tham, K.M., Moon, C.D., 1996. Polymerase chain reaction amplification of the thymidine kinase and protein kinase-related genes of channel catfish virus and a putative pilchard herpesvirus. *J. Virol. Methods* 61, 65–72. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(96\)02070-8](https://doi.org/10.1016/0166-0934(96)02070-8)

V

van Beelen, A.J., Zelinkova, Z., Taanman-Kueter, E.W., Muller, F.J., Hommes, D.W., Zaat, S.A.J., Kapsenberg, M.L., de Jong, E.C., 2007. Stimulation of the Intracellular

Bacterial Sensor NOD2 Programs Dendritic Cells to Promote Interleukin-17 Production in Human Memory T Cells. *Immunity* 27, 660–669. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.08.013>

van de Pavert, S.A., Mebius, R.E., 2010. New insights into the development of lymphoid tissues. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 664–674. <https://doi.org/10.1038/nri2832>

W

Wilson, N.J., Boniface, K., Chan, J.R., McKenzie, B.S., Blumenschein, W.M., Mattson, J.D., Basham, B., Smith, K., Chen, T., Morel, F., Lecron, J.-C., Kastelein, R.A., Cua, D.J., McClanahan, T.K., Bowman, E.P., de Waal Malefyt, R., 2007. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17–producing helper T cells. *Nat. Immunol.* 8, 950–957. <https://doi.org/10.1038/ni1497>

Y

Yang, X., Scheffler, B.E., Weston, L.A., 2006. Recent developments in primer design for DNA polymorphism and mRNA profiling in higher plants. *Plant Methods* 2, 4. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-2-4>

Z

Zheng, Y., Josefowicz, S., Chaudhry, A., Peng, X.P., Forbush, K., Rudensky, A.Y., 2010. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature* 463, 808–812. <https://doi.org/10.1038/nature08750>