



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

Département de Biologie

Mémoire

Présenté par

SEKOURI SARAH

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER En IMMUNOLOGIE

Thème

TLR6 dans les macrophages, entre l'auto-immunité et l'immunité anti-infectieuse

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

Président	SMAHI Mohammed Chemseddine	Professeur	Université de Tlemcen
Encadreur	BENMANSOUR Souheila Amal	Maitre-assistante	Université de Tlemcen
Examineur	Nabila BRAHIMI	MCA	Université de Tlemcen

Année universitaire 2019/2020



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

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

Département de Biologie

Mémoire

Présenté par

SEKOURI SARAH

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER En IMMUNOLOGIE

Thème

TLR6 dans les macrophages, entre l'auto-immunité et l'immunité anti-infectieuse

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

Président	SMAHI Mohammed Chemseddine	Professeur	Université de Tlemcen
Encadreur	BENMANSOUR Souheila Amal	Maitre-assistante	Université de Tlemcen
Examineur	Nabila BRAHIMI	MCA	Université de Tlemcen

Année universitaire 2019/2020

Résumé

Introduction : TLR6 exprimé par les macrophages joue un rôle essentiel dans la régulation de la réponse anti-infectieuse et au processus des maladies auto-immunes.

Objectif : Concevoir des amorces du gène TLR6 par Primer BLAST afin de pouvoir étudier son rôle dans les réponses anti-infectieuses et les maladies auto-immunes.

Matériel et méthodes : Nous avons réalisé une étude bio-informatique pour trouver la séquence du gène TLR6 sur le site www.ensembl.org , puis à partir de la plateforme de la NCBI on a utilisé le primer blast pour obtenir une bonne paire d'amorce de gène TLR6 et on a ensuite confirmé leurs spécificités en confirmant les résultats par PCR inSilico.

Résultats : A la fin de notre étude sur primer blast nos résultats montrent que la paire d'amorce numéro 1 la bonne paire d'amorce avec un produit spécifique à 328pb et le reste sont plus de 1000, avec une longueur d'amorce de 20 bases et une température de la fusion de 58° C et une teneur de GC de 55%.

Conclusion : A partir de cet outil de conception des amorces nous avons pu obtenir facilement notre paire d'amorce du gène TLR6 qui se situe sur le chromosome 4. Ceci nous permettra d'étudier le rôle de TLR6 dans la régulation de la réponse anti-infectieuse et la prédiction des maladies auto-immunes

Mots clés : TLR6 ; réponse anti-infectieuse ; macrophages ; auto-immune, PCR.

Abstract

Introduction: TLR6 expressed by macrophages plays an essential role in the regulation of the anti-infective response and in the process of autoimmune diseases.

Objective: To design primers for the TLR6 gene using Primer BLAST in order to be able to study its role in anti-infectious responses and autoimmune diseases.

Material and methods: We carried out a bioinformatics study to find the sequence of the TLR6 gene on the site www.ensembl.org, then from the NCBI platform we used the primer blast to obtain a good pair of TLR6 gene primer and their specificities were then confirmed by confirming the results by inSilico PCR.

Results: At the end of our primer blast study our results show that primer pair number 1 the correct primer pair with a specific product at 328bp and the rest are over 1000, with a primer length of 20 bases and a melt temperature of 58 ° C and a GC content of 55%.

Conclusion: From this primer design tool we were able to easily obtain our primer pair for the TLR6 gene which is located on chromosome 4. This will allow us to study the role of TLR6 in the regulation of the anti- response. infectious disease and autoimmune disease prediction.

Keywords : TLR6 ; réponse anti-infectieuse ; macrophages ; auto-immune, PCR.

ملخص: TLR6 الذي تعبر عنه البلاعم له دورًا أساسيًا في تنظيم الاستجابة المضادة للعدوى وفي عملية أمراض المناعة الذاتية.

الهدف: تصميم مواد أولية لجين TLR6 باستخدام Primer BLAST من أجل التمكن من دراسة دوره في الاستجابات المضادة للعدوى وأمراض المناعة الذاتية

المواد والطرق: لقد أجرينا دراسة المعلوماتية الحيوية للعثور على تسلسل جين TLR6 على الموقع www.ensemble.org، ثم من منصة NCBI استخدمنا Primer BLAST للحصول على زوج جيد من تم تأكيد التمهيدي الجيني TLR6 وخصائصها من خلال تأكيد النتائج بواسطة *inSilico* PCR.

النتائج: في نهاية دراسة علي منصة Primer BLAST التي أجريناها، تُظهر نتائجنا أن زوج التمهيدي رقم 1 هو زوج التمهيدي الصحيح يحتوي على 328 *paire de base* يزيد عن 1000، بطول تمهيدي يبلغ 20 قاعدة نيكليوتيدية ودرجة حرارة انصهار 58 درجة مئوية ومحتوى GC بنسبة 55%.

الاستنتاجات: ن خلال أداة التصميم التمهيدي هذه، تمكنا بسهولة من الحصول على زوج التمهيدي الخاص بنا من جين TLR6 الموجود على الكروموسوم 4. وهذا سيسمح لنا بدراسة دور TLR6 في تنظيم الاستجابة المضادة. الأمراض المعدية والتنبيؤ بأمراض المناعة الذاتية

الكلمات المفتاحية: TLR6، PCR، العدوى، الالتهاب، المناعة الذاتية.

Avant-propos

Ce mémoire de Master a été réalisé au sein du laboratoire Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie (BIOMOLIM)- Université Aboubaker BELKAID-Tlemcen, sous la direction du Professeur Mourad ARIBI.

Je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire.

En premier lieu, je remercie mon encadreur, **Mme S. Banmansour** qui m'a guidée dans mon travail et m'a aidée à trouver des solutions pour avancer.

Je désire aussi remercier **Mr ARIBI Mourad**.

Je remercie chaleureusement les membres du jury qui me font l'honneur de juger mon travail malgré leurs obligations professionnelles, la distance et leurs emplois du temps chargés.

Un grand merci à ma mère et mon père, pour leur amour, leurs conseils ainsi que leur soutien inconditionnel, qui m'a permis de réaliser les études que je voulais et par conséquent ce mémoire.

Je remercie toute la promotion de Master Immunologie, pour leur soutien et la très bonne ambiance de travail durant ces deux années de master.

Pour finir, je remercie les personnes qui me sont chères pour leur soutien émotionnel.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Résumé en Arabe	V
Avant-propos.....	Vi
Table des matière.....	Vii
Liste des figures	X
Liste des tableaux.....	Xi
Liste des abréviations.....	Xii
Introduction.....	1
1 Revue de la littérature	3
1.1 Les récepteurs de l'immunité inné PRR	4
1.2 La famille des récepteurs TLR	4
1.2.1 Découverte.....	4
1.2.2 Structure et expression de TLR.....	4
1.2.3 Fonctions des TLR	6
1.3 TLR6.....	6
1.3.1 TLR6, historique et structure	6
1.3.2 La voie de signalisation	8
1.3.3 TLR6 et l'immunité anti- infectieuse	8
L'infection par <i>Leishmania major</i>	9
1.3.4 TLR6 et le cancer	10
1.3.5 TLR6 et les maladies inflammatoires	10
1.3.6 TLR6 dans l'auto-immunité	11
1.4 Macrophages.....	12
1.4.1 Origine et le maintien des macrophages	13
1.4.2 Polarisation phénotypique du macrophage.....	14
1.4.3 Rôles dans la réponse innée.....	15
1.4.4 Rôles dans la réponse adaptative.....	16
1.5 Elaboration des amorces pour la PCR	16
1.5.1 PCR.....	16

1.5.2	Principe de la PCR	17
1.5.3	Les acteurs de la PCR.....	17
1.5.4	Les étapes de la réaction de PCR	17
1.6	Choix d'amorce	18
1.6.1	Definition	18
1.7	Base de données	18
	Chapitre 2	19
2	Matériels et méthodes.....	19
2.1	Conception d'amorce	20
2.2	Sélections d'amorce.....	Erreur ! Signet non défini.
2.2.1	La teneur en GC	20
2.2.2	La spécificité évidemment une étape importante pour le test PCR	20
2.2.3	La longueur de l'amorce.....	20
2.2.4	La complémentarité	20
2.2.5	Températures de fusion (T_M).....	21
2.2.6	La séquence à l'extrémité 3	21
2.3	La séquence du gène TLR6.....	21
2.4	Le design de primer.....	22
2.5	Les caractéristiques d'une bonne amorce.....	24
3	Résultats et perspectives	26
3.1	Résultats de la conception d'amorces pour le gène.....	27
3.2	Interpretation des résultats.....	27
3.3	Confirmation des résultats	28
4	Conclusion.....	29

Liste des figures

Figure1.1. Mécanismes d'activation l'hétérodimère TLR6-TLR2

Figure1.2. Précurseurs des macrophages

Figure1.3schémas expliquent l'implication de TLR6 dans la pathogénèse de la sclérose en plaque

Figure1.4. polarisation des macrophages

Figure1.5 phagocytose et l'activation cellulaire par l'hétérodimère TLR2/TLR6

Figure2.1. Site de PCR In Silicon.

Figure 2.2. Base de données " Ensembl " du gène TLR6.

Figure 2.3. Le Site NCBI.

Figure 2.4. L'outil Primer BLAST.

Figure 2.5. Analyse de la séquence d'intérêt par le Primer BLAST.

Figure 3.1. L'obtention des résultats à travers le Primer BLAST.

Figure 3.2. Résultat de primer BLAST.

Figure 3.3. Confirmation des résultats par le logiciel PCR In Silicon.

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Agonistes des molécules TLR humaines

Liste des abréviations

A

AA : acides aminés

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique messenger

ATP : Adénosine-Triphosphate

B

B. abortus : *brucella. Abortus*

PBMC : les cellules du sang périphérique

C

C : cystéine

CCL : chimiokines CC

CD80 : cluster de différenciation 80

CD80L : cluster de différenciation

CG : cystéine-guanine

CPG : la cytosine-phosphate-guanine

Liste des abréviations

CLR : C-Type Lectin Receptors

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

COX-2 : prostaglandine synthase 2

CRC : cancer colorectal

CTP : cytidine triphosphate

D

DAMP : Danger Associated Molecular Pattern

DV: virus de dengue

DC : cellule dendritique

G

G : guanine

H

HSP : Le purpura de Henoch-Schönlein

I

IKK; I κ B kinase

INF: interferon

IRAK: (Interleukin-1 Receptor Associated Kinase-&

Liste des abréviations

IRF8: interferon regulatory factor-8

IL: interleukin

IL1R : récepteur de l'interleukine-1

K

KD :kilo dalton

KLF4: kruppel-like factor

KC: maladie de KAWASAKIE

L

LB : lymphocytes B

LC : Cellule de Langerhans

LT : lymphocytes T

LRR : des répétitions riche en leucines

M

M1 : macrophage pro-inflammatoire

M2 : macrophage anti-inflammatoire

M2a :macrophage anti-inflammatoire de type a

M2b : macrophage anti-inflammatoire de type b

Liste des abréviations

M2c : macrophage anti-inflammatoire de type c

MAPK: Mitogen-activated protein kinases

M. avium : *Mycobacterium avium*

Mg²⁺ : magnésium

MyD88 : la réponse primaire de différenciation myéloïde 88

N

NADPH : La stéatose hépatique non alcoolique

NAFLD : La stéatose hépatique non alcoolique

NF-Kb:nuclear factor-kappa B

NCBI :Centre national d'information sur la biotechnologie

NLR : récepteurs de type NOD

NO : monoxyde d'azote

NOD:nucleotide oligomerization domain receptors

P

PAMP: Pathogen Associated Molecular Pattern

PB : bases

PBMC : les cellules mononuclées du sang périphérique

Liste des abréviations

PCR : polymerase chaine reaction

PU.1 : purine-rich box-1

PRR : récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires.

S

SEP : sclérose en plaque

STAT: signal transducer and activator of transcription

T

TAqPol : taq polymérase

Th1 : lymphocyte T auxiliaire 1

Th2 : : lymphocyte T auxiliaire 2

TGF : facteur de croissance transformant

TIR : translocated intimin receptor

TLR : des récepteurs de type Toll

T_M : température de fusion

TNF- α : facteur de nécrose tumoral

TTP: tyrosine triphosphate

TRAF:TNF Receptor Associated Factor 6

Liste des abréviations

TRIF :TIR -domaine- containing adapter-inducing

V

VIH : virus

Introduction

Le système immunitaire participe au maintien de l'intégrité de l'organisme par des réponses immunitaires innées et acquises. Les cellules de la lignée myéloïde comme les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques sont capables de détecter des agents pathogènes qui expriment spécifiquement des motifs conservés, appelé PAMP grâce à des récepteurs spécifiques nommées les PRR (Pattern recognition receptor). Les PRR ont la capacité aussi de reconnaître les DAMP (Danger Associated Molecular Pattern) ce sont des molécules présentes sur les cellules en nécrose ou en stress(Shcheblyakov et al., 2010).

Les PRR comprennent plusieurs types de récepteurs, les TLR (récepteurs de type Toll), les CLR (C-Type Lectin Receptors), et les NLR (récepteurs de type NOD),les RLR (Récepteurs de type RIG-1). Les TLR constituent la classe des PRR la mieux étudiée et sont caractérisés par leur rôle crucial dans la reconnaissance multiple des micro-organismes. Cette famille se compose de dix membres, TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10 exprimées sur la membrane cytoplasmique bien que d'autres comme TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 sont exprimés sur la membrane des endosomes.(Delneste et al., 2007a)

TLR6 a été décrit pour la première fois par Takeuchi sous la forme d'un polypeptide de contenant 796 acides aminés. L'hétérodimère (TLR2-TLR6) exprimé par les macrophages interagit avec ses ligands qui sont des lipopeptides diacylés, active à son tour une cascade de signalisation impliquant la voie de MyD88 et les facteurs de croissance NF- κ B aboutissant à la production des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF-alpha (facteur de nécrose tumorale), IL-6 ou IL-12 pour une réponse innée protectrice de l'hôte(Marinho et al., 2013). Ce processus est précisément enchainé lors des infections parasitaires (*Leishmania major*), bactériennes (*Mycobacterium avium*) ou virales (virus de la dengue).

Les macrophages jouent un rôle important dans présentation antigénique via ces récepteurs de type péages (TLR) et par l'activation de l'immunité anti-infectieuse par la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires(M1) qui participent à l'élimination du pathogène et l'élaboration de la réponse inflammatoire.

Un dysfonctionnement ou une régulation incorrecte du gène TLR 6 peut conduire à un rapport déséquilibré de cytokines et chimiokines pro et anti-inflammatoires chez l'hôte, contribuant à l'apparition d'un certain nombre de maladies inflammatoires telles que la stéatose hépatique non alcoolique, le cancer colorectal et des maladies auto-immunes comme la sclérose en plaque (Semlali et al., 2019a).

L'expression du gène TLR6 pourrait prédire la susceptibilité individuelle au développement de certaines maladies inflammatoires et de cancers (Semlali et al., 2019a). Ce travail consiste à recueillir des données de la littérature concernant le rôle de TLR6 dans le macrophage et son implication dans l'immunité anti-infectieuse et dans l'auto-immunité, ainsi qu'à la conception d'amorces spécifiques du gène TLR6 qui serviront pour une réplique efficace et optimale par la PCR.

Chapitre premier

Revue de la littérature

1.1. Récepteurs de l'immunité innées	3
1.2. La famille des TLR	4
1.3. TLR6	6
1.4. Macrophages	12
1.5. Elaboration des amorces pour PCR	16
1.6. Choix d'amorce	17

1.1 Les récepteurs de l'immunité inné PRR

Lorsqu'un micro-organisme entre en contact avec les cellules l'organisme, il doit être détecté comme un agent étranger, c'est-à-dire être discriminé du soi, par les cellules du système immunitaire. Cette étape de reconnaissance fait intervenir les récepteurs de l'immunité innée, appelés Pattern recognition receptor (PRR) qui ont la capacité de reconnaître les motifs moléculaires présents sur les micro-organismes (Delneste et al., 2007a) . Parmi les classes fonctionnelles de PRR, on distingue les récepteurs de type Toll (TLR), les C-Type Lectin Receptors (CLR), et les récepteurs de type NOD (NLR)et les Récepteurs de type RIG-1 (RLR). Les PRR sont généralement exprimés par les phagocytes, les cellules dendritiques et les cellules épithéliales ou endothéliales. Ces récepteurs se comportent comme des interfaces moléculaires entre la phase de reconnaissance des agents pathogènes et la phase d'activation d'une réponse immune protectrice. (Plato et al., 2015).

1.2 La famille des récepteurs TLR

1.2.1 Découverte

À la fin du 20e siècle, Toll s'est révélé être un récepteur essentiel pour la défense de l'hôte contre l'infection fongique chez la *drosophile* qui n'a qu'une immunité innée (Takeda et al., 2003).

En 1999, un récepteur homologue a été découvert chez les mammifères et a été appelé toll like récepteur (TLR) et qui induit l'expression de gènes impliqués dans les réponses inflammatoires. Depuis on connaît chez l'homme une dizaine de ces récepteurs de TLR-1 à TLR-10 (tableau 1.1) (Takeda and Akira, 2005).

1.2.2 Structure et expression de TLR

TLR sont des molécules transmembranaires de natures protéiques, Chaque TLR possède un domaine extra cytoplasmique composé de nombreux motifs riches en leucine qui médiate la reconnaissance Pathogen Associated Molecular Pattern (PAMP)

et un domaine intracytoplasmique TIR (toll/IL-1R-like) s'occupe des voies de signalisations.

Les TLR sont soit exprimés de façon extracellulaire sur la surface de la cellule (Par exemple, TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, sont exprimés en grande partie sur la surface cellulaire des cellules immunitaires innée : monocytes, macrophages et cellules dendritiques ou intracellulaires sur la membranes des endosomes (TLR3, TLR7, TLR8 ,TLR9).on peut distinguer les différents membre de TLR et leur agonistes microbiens (tableau 1.1) (Delneste et al., 2007b).

Famille	Agonistes microbiens	Agonistes du soi	Autres
TLR1 (+ TLR2)	Triacyl lipopeptides (bactéries, mycobactéries)		
TLR2	Lipoprotéines/lipopeptides (nombreux pathogènes) Peptidoglycane et acide lipotéichoïque (bactéries Gram positif) * Lipoarabinomannane (mycobactérie) OmpA (bactérie à Gram négatif)	HSP70**	
TLR3	ARN double brin (virus)		
TLR4	Lipopolysaccharide (bactérie à Gram négatif) Protéines virales (RSV, MMTV)	HSP2 Domaines de fibronectine, acide hyaluronique et héparane sulfate	
TLR5	Flagelline (bactérie)		
TLR6 (+ TLR2)	(Mycoplasme)		
TLR7	ARN simple brin (virus)		Drogues (imidazoquinoline, loxoribine, bropirimine)
TLR8	ARN simple brin (virus)		Imidazoquinoline
TLR9	ADN hypométhylé		

	(bactérie) Hémione		
--	--------------------	--	--

Tableau1.1 : Agonistes des molécules TLR humaines.

1.2.3 Fonctions des TLR

- La caractérisation fonctionnelle des récepteurs de type Toll (TLR) est de reconnaître une grande variété des agents pathogènes.(Takeda and Akira, 2005).
- L'engagement des Pathogen Associated Molecular Pattern (PAMP) avec les TLR induit un ensemble de réactions moléculaires qui conduisent à des réponses immunitaires innées efficaces et au développement d'une immunité acquise spécifique au micro-organisme
- Les TLR jouent un rôle crucial lors d'infection tant bactériennes, fongiques, parasitaires ou virales en permettent l'induction de la réponse immunitaire pro-inflammatoire nécessaire pour éliminer les micro-organismes détectés. Les TLR sont aussi capables de reconnaître les Danger Associated Molecular Pattern (DAMP) sont des molécules présentes sur les cellules en nécrose et sur des produits de dégradation de la matrice extracellulaire.

1.3 TLR6

1.3.1 TLR6, historique et structure

Le TLR6 est un membre de la famille TLR. TLR6 a été décrit pour la première fois par Takeuchi sous la forme d'un polypeptide de 91,9 kDa contenant 796 acides aminés(aa)

Le gène TLR6 humain a un seul exon, est situé sur le chromosome 4p13. Le TLR6 humain est un gène de 2391 paires de bases qui code pour une protéine transmembranaire de 796 aa de type I contient des répétitions riche en leucines (LRR) une protéine extracellulaire de 630aa (y compris un peptide signal 31aa), un domaine transmembranaire de 21aa et un domaine de signalisation TIR intracellulaire de 145 aa. Il contient également un peptide signal N-terminale 20 motifs riche en leucine extracellulaire répétés en tandem, et un domaine cytoplasmique homologue au récepteur de l'interleukine-1 (IL1R)(Tantisira et al., 2004). Récemment, un polymorphisme codant commun a été identifié dans ce gène qui conduit à un échange de sérine en proline en position 249 dans le domaine extracellulaire de la protéine TLR(Mukherjee et al., 2019).

Ce récepteur est exprimé par les cellules de l'immunité innée telles que, les cellules dendritiques, les macrophages tissulaires, les cellules épithéliales et les neutrophiles

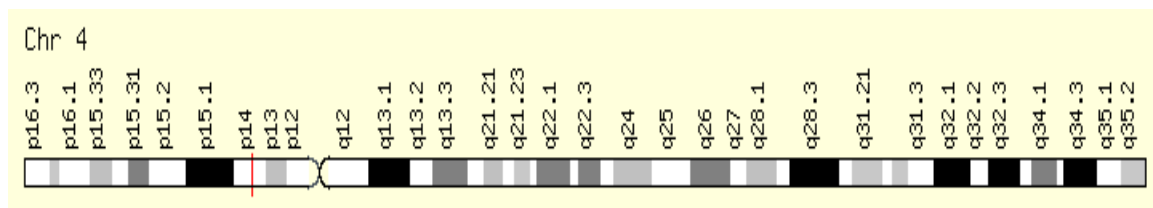


Figure 1.1 Gène TLR6 en localisation génomique

1.3.2 La voie de signalisation

La majorité des TLR semblent fonctionner comme des homéomères, à l'exception du TLR6, qui forme des hétérodimères avec TLR2, après l'interaction de l'hétérodimère (TLR2-TLR6) avec leur ligand qui sont des lipopeptides diacylés (figure1.1).

Après reconnaissance du ligand, la molécule cytoplasmique MyD88 qui contient un domaine TIR recrute Interleukin-1 Receptor Associated Kinase (IRAK1) au récepteur lors de la liaison ligand ensuite, IRAK active TNF Receptor Associated Factor (6TRAF6) menant à l'activation de I κ B kinase (IKK). Ce complexe IKK phosphoryle I κ B, ce qui entraîne la translocation nucléaire des facteurs de transcriptions- κ B, impliqués dans l'induction de nombreux gènes, principalement pro-inflammatoires ((Ren et al., 2016).

Une dérégulation de l'expression de TLR6 ou un dysfonctionnement au niveau des séquence du gène peut entraîner un déséquilibre des cytokines et de chimokines pro-anti inflammatoires contribuant à l'apparition de certaines maladies inflammatoires et de cancers (Semlali et al., 2019b). La compréhension des TLR et de leurs voies de signalisation pourrait révéler de nouvelles cibles thérapeutiques dans les septicémies et d'autres maladies à médiation immunitaire.

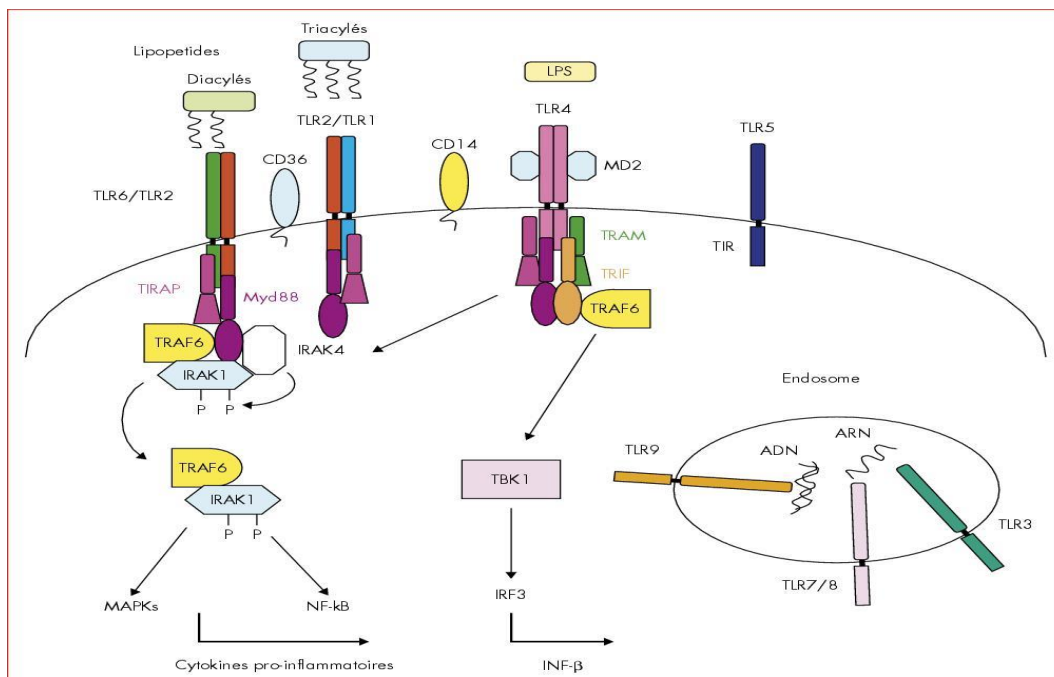


Figure1.2 mécanismes d'activation l'hétérodimère TLR6-TLR2(Satta et al., 2008)

1.4 TLR6 et l'immunité anti- infectieuse

La reconnaissance de PAMPS par les TLR abondants à la surface des macrophages déclenchent une série de réponses immunitaires spécifiques conduisant entre autres à la

sécrétion de nombreuses molécules à activité bactéricides et inflammatoires pour éliminer le micro-organisme détecté.

De plus, les macrophages sont la cible de nombreuses bactéries intracellulaires (mycobactéries) et des parasites (les leishmanies).

1.4.1.1 L'infection par *brucella. Abortus*

Brucella. Abortus est un pathogène intracellulaire appartient à la famille des bactéries de gram-. *B. abortus* est reconnu par l'hétérodimère TLR2-TLR6 conduit à une activation intracellulaire dépendent NF- κ B et la voie de signalisation Mitogen-activated protéine kinases (MAPK) induit par la suite la production des cytokines pro- inflammatoires IL-12 par les macrophages et les cellules dendritiques. Des recherches ont montré que les cellules dendritiques (DC) infecté par *b. abortus* nécessite le TLR6 pour initier la réponse inné pro-inflammatoire de plus, le TLR-6 en coopérations avec les récepteurs de types NOD ou les récepteurs de lectine de type C améliore la résistance à l'infection(Almeida et al., 2013).

1.4.1.2 L'infection par *Mycobacterium avium*

TLR2 et TLR6 interagissent en synergie pour la reconnaissance de *M. avium* qui induit une cascade de signalisation intracellulaire active la production des cytokines pro- inflammatoires par les macrophages.

Des expériences ont montré que TLR6 est nécessaire pour l'activation induite par *M. avium* des MAPKs et du NF- κ B dans les cellules dendritiques et, un manque de TLR6 affecte la production IL-12 et TNF- α par les cellules dendritiques en réponse à *M. avium*. (Marinho et al., 2013). A cet égard TLR6 est critique pour la production de cytokines pro-inflammatoires dans les cellules dendritiques infectés par *M. avium*.

1.4.1.3 L'infection par *Leishmania major*

Leishmania major est un parasite protozoaire détecté par TLR2, TLR1 et TLR6 des macrophages. L'association de l'hétérodimère TLR2-TLR-6 assure une action antileishmanial contre les cellules infectés par la stimulation de la production de TNF - α , par les macrophages (Pandey et al., 2014). L'infection par le virus de la dengue (DV).

1.4.1.4 Infection par le virus de la dengue

Le virus de la dengue transmise par les moustiques, est un membre de la famille des *Flaviviridae*, Le génome du virus de la dengue code pour une poly protéine unique qui se

compose de 3 protéines structurales (capside, pré membrane et enveloppe) qui forment la structure physique de la particule virale et de 7 protéines non structurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5) nécessaires à la réplication du virus (Chen et al., 2015). Le TLR2 et TLR6 sont activés pendant l'infection par le virus de la dengue et plus précisément par la protéine NS1 et cette activation conduit à une augmentation de la sécrétion d'IL-6 et la production de TNF- α .

On conclusion, le TLR6 est impliqué dans des infections bactériennes, fongiques et virales en raison pour favoriser une réponse immunitaire protectrice de l'hôte.

1.4.2 TLR6 et le cancer

1.4.2.1 Le cancer colorectal (CRC)

L'une des tumeurs malignes les plus courantes dans le monde, et est le type de cancer le plus répandu et la deuxième cause de mortalité associée au monde, les patients atteints de CCR ne sont normalement diagnostiqués que lorsque la maladie a atteint un stade avancé.(Kim et al., 2020) .

Les tissus du CRC présentent une expression plus élevée des gènes TLR1, TLR2, TLR4, TLR8 et TLR9 par rapport au TLR6, Donc le TLR6 peut présenter une fonction anticancéreuse en termes de risque de développement d'un cancer colorectal par contre des modifications dans les exons du gène comme l'hyperméthylation de la cytosine-phosphate-guanine (CpG) ou des mutations d'une nucléotide (les altérations des ARN non codants) aboutis à la formation de cancer du côlon. Des études récentes montrés que le polymorphisme du TLR6 rs3796508 est un protecteur contre le CRC (Semlali et al., 2019a).

1.4.3 TLR6 et les maladies inflammatoires

1.4.3.1 Maladie de KAWASAKI (KD)

Est une maladie génétique cardiovasculaire acquise chez l'enfant moins de 5ans, cette pathologie inflammatoire touche les artères, en particulier les artères coronaires.

Son étiologie est resté toujours mal connue, mais sur le plans immunitaire le TLR6 s'associe à la KD à la suite d' diminution dans la stimulation de facteur de transcription de NF-KB qui joue un

rôle dans la régulation de IL-6, ainsi favorisent une sécrétion minimal d'IL-6 contribue à une inflammation vasculaire prolongé (Kim et al., 2017).

1.4.3.2 Le purpura de Henoch-Schönlein (HSP)

Le purpura de Henoch-Schönlein (HSP) est une maladie inflammatoire pédiatrique. Elle touche les vaisseaux sanguins de la peau, des reins et du tractus gastro-intestinal. Plusieurs pathogènes infectieux, médicaments, aliments et/ou piqûres d'insecte pourraient déclencher la maladie.

Au niveau cellulaire, HSP se manifeste par un déséquilibre de la balance Th1 / Th2 dans la phase aiguë et de l'activation des cellules T auxiliaires de type 2 (Th2) dominante de plus, les cellules Th17 sont activées anormalement ce qui favorise l'inflammation chronique cela se résume par la liaison de TLR6 Avec leurs ligands spécifiques qui influence l'activité (Th2) et Th17 provoquant une surexpression de l'IL-17 et IL-4 impliqué à l'apparition de HSP.

Des études sur cellules mononuclées du sang périphériques PBMC qui contient des niveaux d'expression de la protéine TLR6 et de l'ARNm MYD88 chez patients pédiatriques atteints de HSP (CHANG et al., 2015) démontre que l'activation de TLR6 peut médier l'immunopathogénèse de HSP.

1.4.3.3 TLR6 et l'obésité

La stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) est un syndrome métabolique associée à l'obésité caractérisée par une accumulation excessive de graisses dans le foie sous forme de triglycérides. L'hétérodimère TLR2/ TLR6 et TLR6 dans le foie ou dans les hépatocytes exercent une activité positive qui favorise la pathogénèse NAFLD à progresser. Premièrement, par une expression accrue de TLR6 suivie d'une production de cytokines par les macrophages pro-inflammatoires M1dérégulés dans le foie et deuxièmement, le TLR6 dérégulé potentialisant l'activité en aval de TLR2 / TLR6 en contribuant à la progression vers des formes plus sévères chez les patients atteints NAFLD liés à l'obésité(Arias-Loste et al., 2016).

1.4.4 TLR6 dans l'auto-immunité

L'auto-immunité est la conséquence de l'activation des lymphocytes auto réactifs et perte de tolérance auto-immunologique.

La sclérose en plaque est une maladie auto-immune qui affecte le système nerveux central (SNC), elle se caractérise par la destruction de la myéline a cause des réactions inflammatoire non contrôlés (démýélisation)

Le TLR6 dans le SNV est présenté par les cellules endothéliales les macrophages, les astrocytes, les microglies, et d'autres cellules infiltrées.

Son expression est élevée dans la maladie de SEP en conséquence de leur participation aux réactions inflammatoire neuronales, l'hétérodimère TLR2/TLR6 stimulé par des dérivées de SNC comme la protéine de choc thermique (HSP60, HSP7) ou par d'autres molécules exogènes (PAMP) cela induit la production excessive des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines par des macrophages M1 et M2a, stimulent les lymphocytes auto-réactifs (figure1.4). Donc, ces lymphocytes auto-réactifs contribue à la démyélinisation neuronale et axonale dans la pathogénèse de sclérose en plaque.

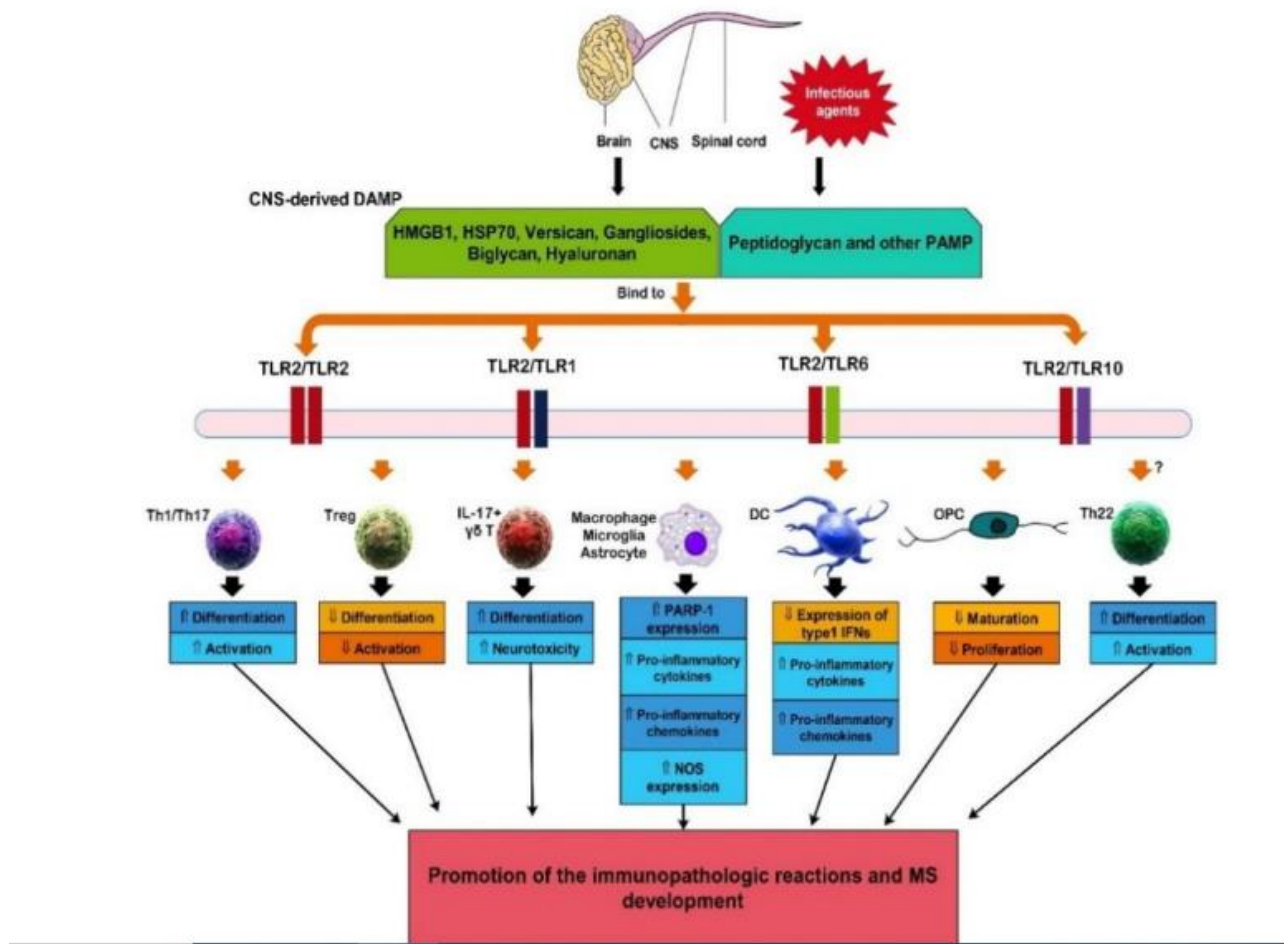


Figure1.3schémas expliquent l'implication de TLR6 dans la pathogénèse de la sclérose en plaque (SEP)(Jafarzadeh et al., 2019)

1.5 Macrophages

Les macrophages ont été parmi les premières cellules effectrices immunitaires décrites. En 1882 E. Metchnikoff avait observé des grandes cellules mononucléaires très mobiles capables de phagocyter des bactéries chez des invertébrés face à cette découverte a reçu à juste titre un prix Nobel(Cavaillon, 2011).les macrophages sont des cellules qui patrouillent constamment les tissus périphériques contribuent au processus inflammatoires ,anti-infectieuse, et la réparation des plaies, ces cellules participent en outre à l'homéostasie tissulaire(Funes et al., 2018).

1.5.1 Origine et le maintien des macrophages

Les macrophages sont des cellules modulatrices présentes dans presque tous les organes ce qui reflète leur importance dans l'immunité. On distingue deux types de macrophages en fonction de leurs origines (figure 1.2)

Macrophages d'origine embryonnaire : les macrophages résidents développée à partir des cellules souches embryonnaires de sac vitellin et le foie foetal qui se caractérisent par la longévité et auto-renouvellement. Cette population portent différents noms en fonction du tissu dans lequel ils sont retrouvés : les macrophage de foie [cellules de Kupffer (KC)],de l'épiderme cellules de Langerhans (LC) et de cerveau (microglie) (Funes et al., 2018)

Macrophages d'origine hématopoïétique : des monocytes dérivés de cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuses infiltrent le sang et est donne naissance à des macrophages tissulaires en réponse à différents signaux environnementaux comme les facteurs de transcription purine-rich box-1 (PU1), interferon regulatory factor-8 (IRF8) et Krüppel-like factor-4 (KLF4), les facteurs de croissance macrophages colony-stimulating factor(M-CSF).

En homéostasie, les monocytes c sont continuellement recrutés pour peupler les niveaux de DC et de macrophages dans l'intestin et le derme .(Sprangers et al., 2016)

L'origine, la différenciation et le développement mettre en évidence l'hétérogénéité phénotypique des macrophages.










Precursor	Cell type	Organs and factors that shape macrophage tissue specificity	Function
Embryonic origin	Kupffer cell	 Liver	Immunosurveillance Detoxification Iron and cholesterol recycling
	Marginal zone macrophage Red pulp macrophage	LXR Heme ↓ Spi-C  Spleen	Immunosurveillance Detoxification Iron recycling Antigen delivery to DCs
	Microglia	CD200 CX ₂ CL1 TGF-β  Brain	Immunosurveillance Clearing of cellular debris Synaptic pruning during development and adulthood
	Peritoneal macrophage	Retinoic acid ↓ Gata-6  Peritoneum	Immunosurveillance Support of IgA production by peritoneal B1 cells
	Alveolar macrophage	Surfactant CSF-2 CD200  Lungs	Immunosurveillance Phagocytosis of excessive surfactants and surfactant-opsionized particles
Adult Ly6C ^{hi} monocyte	Osteoclast	CSF-1 RANKL  Bone	Bone and joint remodeling through resorption
	Mammary gland macrophages	CSF-1 TGF-β  Mammary gland	Immunosurveillance Support of branching morphogenesis
	Muscularis gut macrophage	 Gut	Regulation of smooth muscle contractions
	Intestinal lamina propria macrophage	IL-10  Intestine	Immunosurveillance Maintenance of gut homeostasis Cytokine production to establish mucosal immunity Luminal antigen uptake

Figure1.3.origines et distribution des macrophages(Varol et al., 2015).

1.5.2 Polarisation phénotypique du macrophage

Les macrophages sont classés en deux phénotypes différents répondants aux stimuli recevez et les signaux micro-environnementaux qui se rencontrent dans chaque tissu spécifique, les macrophages M1 classiquement active et les macrophages M2 alternativement activé (figure).

1.5.2.1 Les macrophages M1

Le phénotypes M1 stimulé par IFN- γ et TLR conduit à la production de chimiokines pro inflammatoires TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 et cyclooxygénase-2 (COX-2), et de faibles niveaux d'IL-10.),ils i expriment des niveaux élevés de complexe d'histocompatibilité principal de classe II (MHC-II), de marqueur CD68 et de molécules Costimulatrices CD80 et CD86(Martinez and Gordon, 2014).

Ils déclenchent des mécanismes microbicides par la production de NO, participent à l'élimination des agents pathogènes lors de l'infection par l'activation du système de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), les macrophages M1 contribuent aux phases d'élimination d'équilibre médiées par les lymphocytes T au Cours de la progression tumorale et dans la réplication de virus Inhibe la réplication du VIH aux premières étapes de la pré-intégration. Finalement Pour se protéger contre de tels dommages tissulaires, la réponse inflammatoire chronique est inhibée par des mécanismes de régulation entraînés par la fonction anti-inflammatoire des macrophages M2.(Chávez-Galán et al., 2015).

1.5.2.2 Macrophages M2

Les macrophages M2 anti-inflammatoires induit par STAT6 via le récepteur alpha IL-4 (IL-4R α) se caractérise par une faible production d'IL-12 et une production élevée d'IL-10 et de TGF- β et des chimiokines, telles que CCL1, CCL13, CCL18, CCL22 et CCL24. Les M2 comprend M2a, M2b et M2c, M2a stimulé par IL - 4, IL - 10, IL - 13, participent à la résistance tumorale et jouent un rôle dans l'hyper sensibilité de type 1et4, M2b activé par induction des récepteurs FC, les complexe immuns et les antagonistes des récepteurs Toll-like (TLR) cette sous population active le Th2 et orchestrent le remodelage des tissus, et les M2c induit par Glucocorticoïdes, IL - 10, TNF- α , participent à la réparation tissulaire lui favorise une capacité puissante dans le processus de la phagocytose (Chistiakov et al., 2015),(Shapouri-Moghaddam et al., 2018).

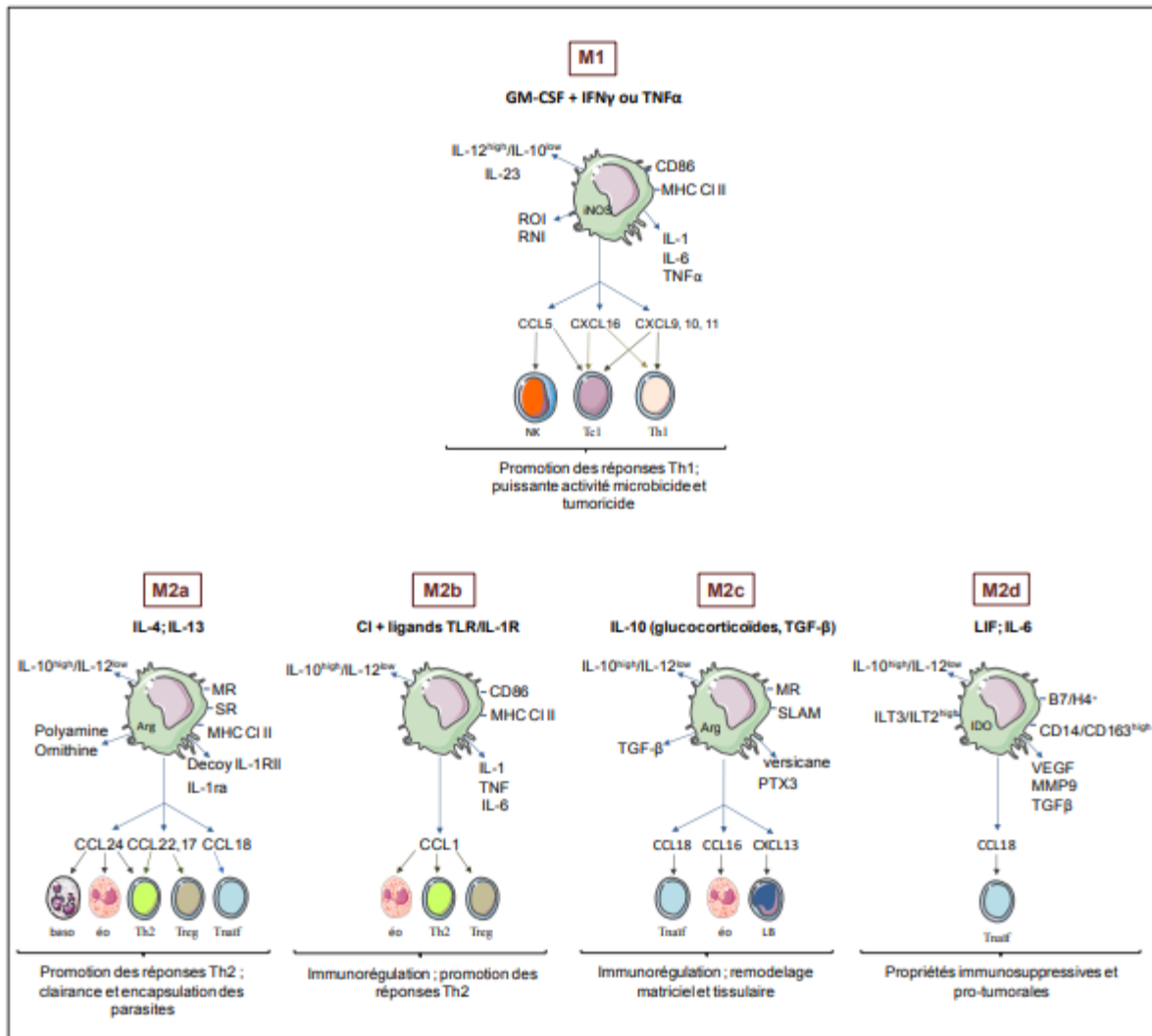


Figure 1.4. Polarisation des macrophage (Martinez and Gordon, 2014)

1.5.3 Rôles dans la réponse innée

1.5.3.1 Phagocytose

La phagocytose est une étape clés de la réponse immunitaire innée contre le pathogène indiquées par les macrophages, cette l'activité phagocytaires, implique une série d'événements structurés comprenant la reconnaissance des agents pathogènes par les récepteurs de surface cellulaire (la famille TLR), l'endocytose médiée par les récepteurs, la fusion du phagosome avec l'endosome, la digestion des agents pathogènes, ainsi que la présentation de antigènes via le CMH (Gordon and Plüddemann, 2017).

1.5.3.2 Activation cellulaire

Les macrophages exprimant les récepteurs TLR induisent l'activation transcriptionnelle de gènes codant des cytokines pro-inflammatoires via la voie de signalisation MyD88 et TRIF pour un profil M1 qui sécrètent IL-6 et TNF-. Ces cytokines participent à l'élimination du pathogène et l'élaboration de réponse inflammatoire (Doyle et al., 2004).

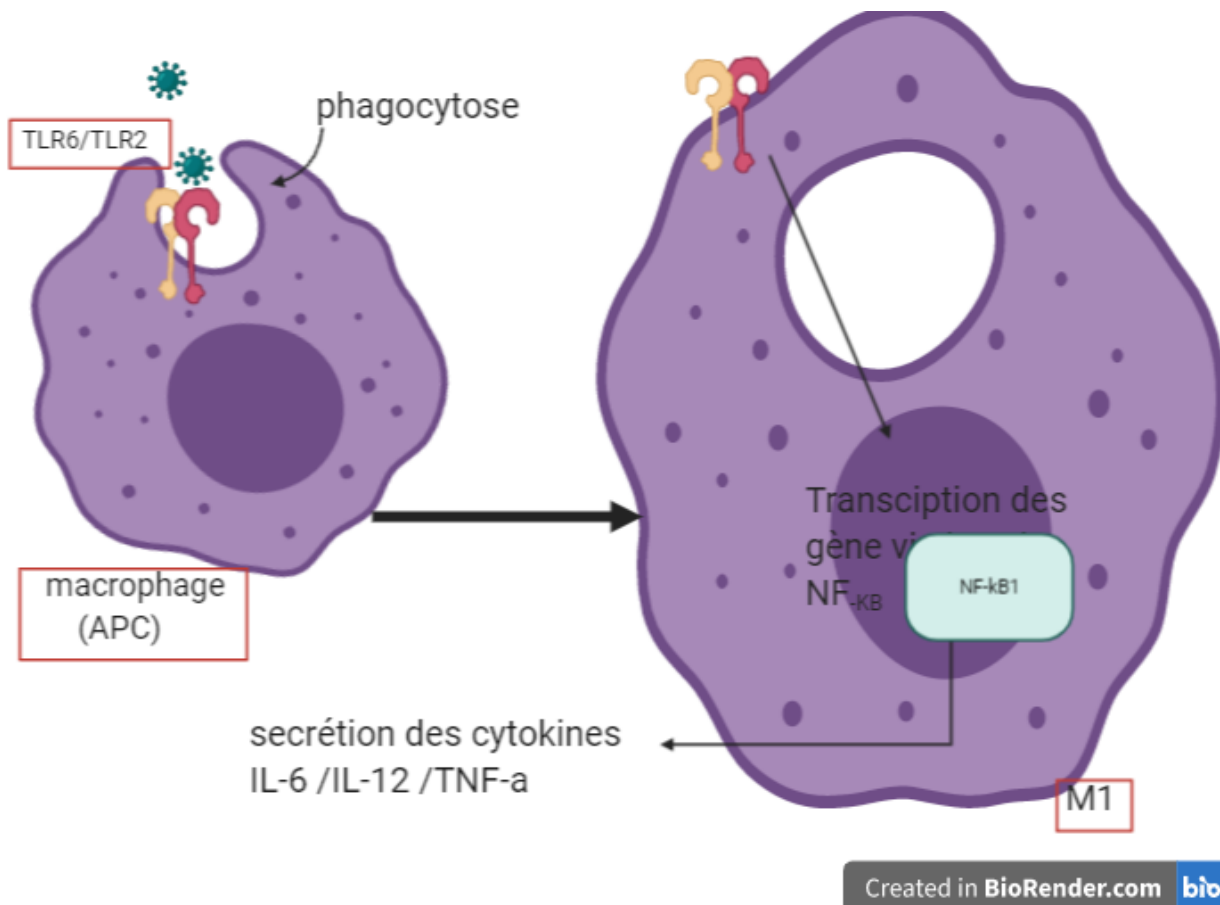


Figure 1.5 phagocytose et l'activation cellulaire par l'hétérodimère TLR2/TLR6

1.5.4 Rôles dans la réponse adaptative

Les macrophages interviennent dans l'immunité adaptative par la présentation de l'antigène aux cellules T helpers (Th).

1.6 Elaboration des amorces pour la PCR

1.6.1 PCR

La « Polymerase Chain Réaction » ou PCR, est une technique de réplication ciblée *in vitro* utilisée pour amplifier un fragment d'ADN (**acide désoxyribonucléique**) particulier (Rk et al., 1985). Et est un outil quasiment universel dans le domaine de la biologie.

1.6.2 Principe de la PCR

La PCR est une suite de cycles, qui se répètent plusieurs fois successivement, comportant chacune trois étapes de température. En moyenne une PCR comporte entre 20 et 40 cycles.

1.6.3 Les acteurs de la PCR

- **L'ADN**

avant la réaction de PCR, l'ADN purifié doit contenir le fragment d'ADN qu'on veut amplifier

- **Les deux amorces**

Ce sont des fragments courts d'ADN, capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases, sur l'un des deux brins d'ADN.

- **ADNp (ADN polymérase ou TAKp)**

L'enzyme utilisée est une polymérase, c'est-à-dire qu'elle peut synthétiser un nouveau brin d'ADN à partir du brin d'ADN matrice après s'être fixée à une amorce.

- **Les DésoxyriboNucléotides-Tri-Phosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)** ce sont des nucléotides précurseurs d'ADN constitué de résidus d'adénine (d'ATP), cystéine (d'CTP), guanine (d'GTP) et thymine (d'TTP).

Ces nucléotides sont utilisés par l'enzyme la Taq Pol pour synthétiser les brins d'ADN complémentaires.

1.6.4 Les étapes de la réaction de PCR

Une réaction de PCR se déroule par répétitions successives des trois étapes suivantes :

- **Dénaturation** de l'ADN par fusion à haute température pour convertir l'ADN bicaténaire en ADN monocaténaire. Cette étape est réalisée à une température comprise entre 93 et 96°C.

- **Hybridation** à l'ADN cible de deux oligonucléotides utilisés comme amorces. Cette hybridation a lieu à une température comprise entre 55 et 65°C.

- **Extension** de la chaîne d'ADN par addition de nucléotides à partir des amorces en utilisant l'ADN polymérase (2) comme catalyseur en présence d'ions Mg^{2+} . La température optimale de travail de l'ADN polymérase est de 72°C.

Cet enchaînement d'étapes qui constitue un cycle d'amplification est reproduit successivement de 20 à 50 fois (Garibyan and Avashia, 2013).

1.7 Choix d'amorce

1.7.1 Définition

Les amorces sont de courtes séquences oligonucléotidiques d'ADN monocaténaire, utilisées lors des PCR pour commencer l'amplification.

Les amorces doivent donc être :

- Spécifique de la séquence à amplifier.
- Complémentaires des brins d'ADN existants ;
- Orientées dans le bon sens de façon à permettre la synthèse d'ADN de 5' en 3'.
- 40% en CG surtout dans la région 3' (pour augmenter la stabilité puisqu'ils ont trois liaisons d'hydrogène).
- Les amorces utilisées pour la PCR ont des longueurs habituellement comprises entre 17 et 25 nucléotides.

1.8 Base de données

Un ensemble de données structurées, généralement en champs, organisé en vue de son utilisation par des programmes correspondant à des applications distinctes.

NCBI (Le Centre national d'information sur la biotechnologie) est la base de données la plus exécutive utilisé dans notre travail.

Chapitre 2

2 Matériels et méthodes

2.1 Conception d'amorce	20
2.2 Sélection d'amorce	20
2.3 la séquence du gène TLR6	21
2.4 Le design de primer	23
2.5. Les caractéristiques d'une bonne amorce	25

2.1 Conception d'amorce

La conception d'amorce est. Au cours de la conception d'amorce pour une zone précise d'ADN souhaité a amplifié, une amorce doit être orientée dans le sens 5' → 3' (brin sens) et l'autre amorce doit compléter le brin (anti sens) 3' → 5' (Albert et al., 1990). De plus on cherchera à respecter certaines règles de base dans la conception d'amorce comme la spécificité, la sensibilité, la température.

La séquence d'amorce apporte plusieurs paramètres, telles que la position et la longueur du produit, sa température de fusion et finalement le rendement (Innis et al. 1988).

2.2 Sélections d'amorce

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

2.2.1 La teneur en GC

La température de la fusion des amorces constituant la PCR ait autant que possible la même température de 55–72 °C pour obtenir les meilleurs résultats, elle correspond à une longueur d'amorce de 18–24 bases. La T_m finale pour les deux amorces ne doivent pas différer de plus de 5 °C (Lorenz, 2012).

2.2.2 La spécificité évidemment une étape importante pour le test PCR

La spécificité amorce dépend au moins partiellement de la longueur de l'amorce. Il est évident qu'il y a beaucoup plus d'oligonucléotides uniques à 24 paires de bases qu'à 15 paires de bases.

2.2.3 La longueur de l'amorce

Ce paramètre est essentiel pour le succès de la PCR. En général, la longueur idéale de l'amorce doit être de 15 à 30 bases (Lorenz, 2012).

2.2.4 La complémentarité

Une amorce à brin sens et une amorce à brin anti sens, ne doivent pas être complémentaires l'une de l'autre, et l'extrémité 3' d'une seule amorce ne peut pas être complémentaire d'autres séquences de l'amorce. Ces deux scénarios entraînent la formation des structures de boucles en épingle à cheveux et des dimères d'amorce. (Lorenz, 2012).

2.2.5 Températures de fusion (T_M)

La température de la fusion des amorces constituant la PCR ait autant que possible la même température de 55–72 °C pour obtenir les meilleurs résultats, elle correspond à une longueur d'amorce de 18–24 bases. la T_M finale pour les deux amorces ne doivent pas différer de plus de 5 °C (Lorenz, 2012).

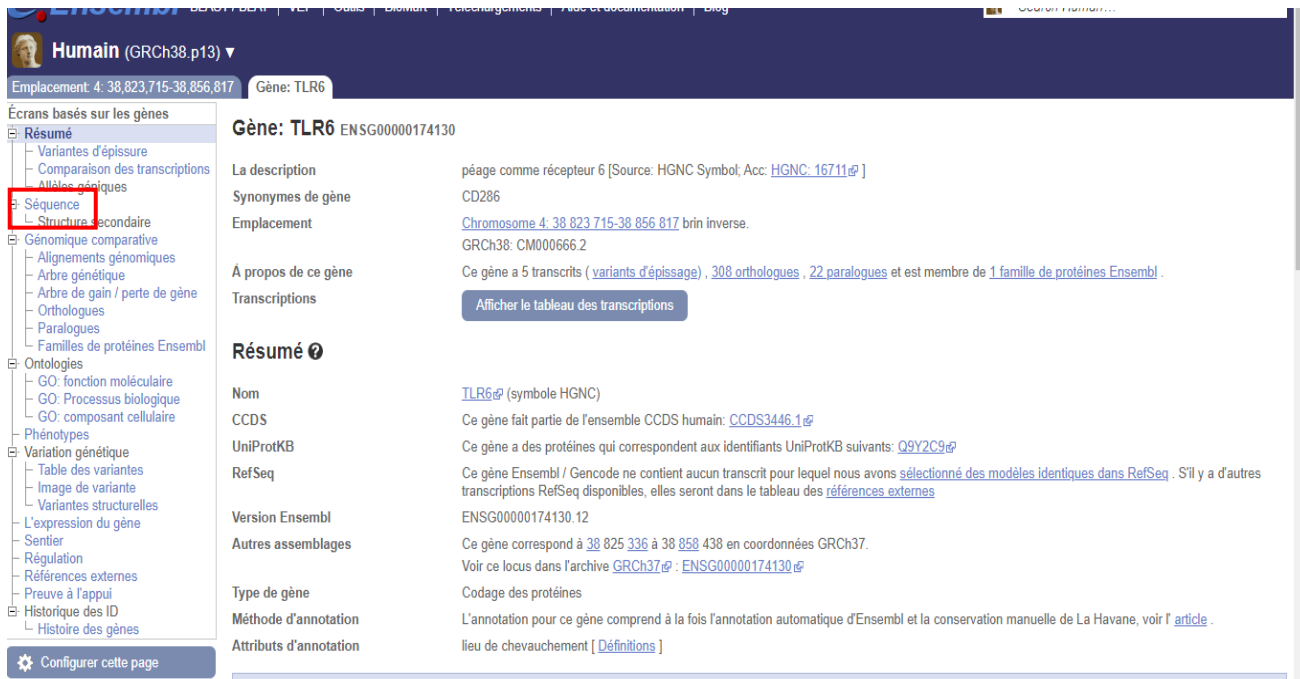
2.2.6 La séquence à l'extrémité 3'

Il est nécessaire que la position terminale 3' dans les amorces PCR est essentielle pour empêcher le mésamorçage. Le problème des homologues d'amorce se produisant dans ces régions a déjà été examiné. Une autre variable à considérer est l'inclusion d'un résidu G ou C à l'extrémité 3' des amorces. Ce « crampon GC » contribue à la fixation correcte à l'extrémité 3' en raison de la liaison hydrogène plus forte des résidus G/C. Cela contribue également à une plus grande efficacité de la réaction en réduisant au minimum la « respiration » qui pourrait se produire (BELAID, 2017).

2.3 La séquence du gène *TLR6*

Nous avons recherché la séquence du gène TLR6 par l'utilisation de la base de données « ENSEMBL » via le site « www.ensembl.org » (Figure 2.1).

The screenshot shows the Ensembl genome browser interface. At the top, there is a navigation bar with links for BLAST/BLAT, VEP, Outils, BioMart, Téléchargements, Aide et documentation, and Blog. Below this is a search bar where 'tlr6' has been entered, and a search button. The results show 465 results corresponding to 'tlr6' for the species 'Humain'. The first result is 'TLR6 (gène humain)' with the Ensembl ID 'ENSG00000474430'. Below this, there are links for 'TLR6-201 (transcription humaine)' and 'TLR6-202 (transcription humaine)'. The interface also includes filters for 'Sélection actuelle' (all species, human only), 'Restreindre la catégorie à' (Gene, Transcription, GeneTree, etc.), 'Par page' (10, 25, 50, 100), and 'Disposition' (norme, Table).



Humain (GRCh38.p13) ▼

Emplacement: 4: 38,823,715-38,856,817 Gène: TLR6

Écrans basés sur les gènes

- Résumé
- Variantes d'épissage
- Comparaison des transcriptions
- Allèles géniques
- Séquence**
- Structure secondaire
- Génomique comparative
- Alignements génomiques
- Arbre génétique
- Arbre de gain / perte de gène
- Orthologues
- Paralogues
- Familles de protéines Ensembl
- Ontologies
 - GO: fonction moléculaire
 - GO: Processus biologique
 - GO: composant cellulaire
- Phénotypes
- Variation génétique
 - Table des variantes
 - Image de variante
 - Variantes structurelles
- L'expression du gène
- Sentier
- Régulation
- Références externes
- Preuve à l'appui
- Historique des ID
- Histoire des gènes

Gène: TLR6 ENSG00000174130

La description péage comme récepteur 6 [Source: HGNC Symbol; Acc: [HGNC:16711](#)]

Synonymes de gène CD286

Emplacement [Chromosome 4: 38,823,715-38,856,817](#) brin inverse.
GRCh38: CM000666.2

A propos de ce gène Ce gène a 5 transcrits ([variants d'épissage](#)), [308 orthologues](#) , [22 paralogues](#) et est membre de [1 famille de protéines Ensembl](#) .

Transcriptions [Afficher le tableau des transcriptions](#)

Résumé

Nom [TLR6](#) (symbole HGNC)

CCDS Ce gène fait partie de l'ensemble CCDS humain: [CCDS3446.1](#)

UniProtKB Ce gène a des protéines qui correspondent aux identifiants UniProtKB suivants: [Q9Y2C9](#)

RefSeq Ce gène Ensembl / Gencode ne contient aucun transcrit pour lequel nous avons [sélectionné des modèles identiques dans RefSeq](#) . S'il y a d'autres transcriptions RefSeq disponibles, elles seront dans le tableau des [références externes](#)

Version Ensembl ENSG00000174130.12

Autres assemblages Ce gène correspond à [38,825,336](#) à [38,858,438](#) en coordonnées GRCh37.
Voir ce locus dans l'archive [GRCh37](#) : [ENSG00000174130](#)

Type de gène Codage des protéines

Méthode d'annotation L'annotation pour ce gène comprend à la fois l'annotation automatique d'Ensembl et la conservation manuelle de La Havane, voir l' [article](#) .

Attributs d'annotation lieu de chevauchement [[Définitions](#)]

[Configurer cette page](#)

Figure 2.1. Base de données " Ensembl " du gène TLR6.

Ensuite, on a obtenu la séquence du gène TLR6 qui contient des introns et des exons, on l'a copié et l'a collé dans un document Word, puis nous avons choisi et mis exon 2 dans un cadre.

2.4 Le design de primer

À travers le centre national de l'information biotechnologique (NCBI) et par l'utilisation du logiciel Primer blaste dans le site « [www. Ncbi. nlm. nih. Gov](http://www.Ncbi.nlm.nih.Gov) » on a conçu l'amorce spécifique du gène TLR6 (Figure 2.2).

Chapitre 3. Résultats

The screenshot shows the NCBI website interface. At the top, there is a search bar and a navigation menu. A prominent red banner at the top center contains COVID-19 information. Below this, the 'All Resources' section is visible, with a sub-menu containing 'All', 'Databases', 'Downloads', 'Submissions', 'Tools', and 'How To'. The 'Tools' tab is highlighted with a red box. The 'Tools' section lists several resources: '1000 Genomes Browser', 'Amino Acid Explorer', 'BLAST Microbial Genomes', 'BLAST RefSeqGene', and 'BLAST Tutorials and Guides'. The 'All Resources' link in the left sidebar is also highlighted with a red box.

Figure 2.2. Le Site NCBI.

Pour la réalisation de notre amorce, on a suivi les étapes de primer blast qui sont résumées ci-dessous :

Premièrement, nous avons dirigé vers la plate-forme Primer BLAST (Figure 2.3).

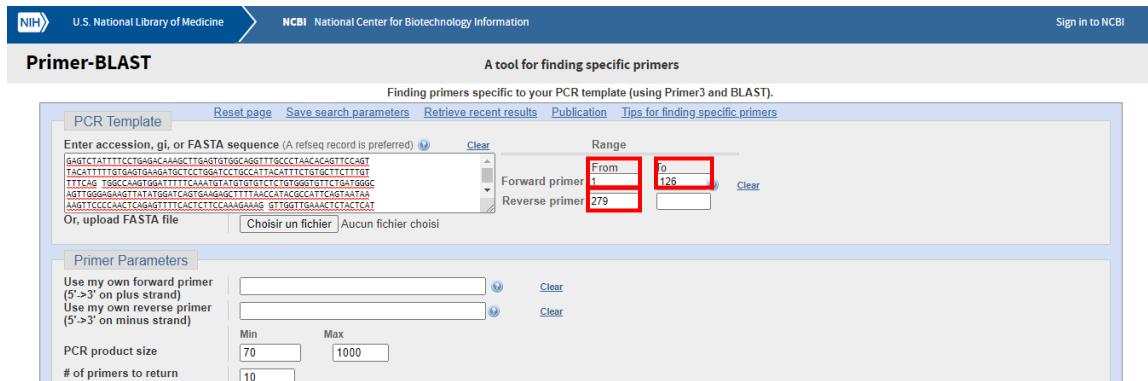
The screenshot shows the Primer BLAST tool interface. It features a list of tools with descriptions. The 'Primer-BLAST' tool is highlighted with a red box. The description for Primer-BLAST states: 'L'outil Primer-BLAST utilise Primer3 pour concevoir des amorces PCR sur une matrice de séquence. Les produits potentiels sont ensuite automatiquement analysés avec une recherche BLAST sur des bases de données spécifiées par l'utilisateur, pour vérifier la spécificité de la cible visée.' Other tools listed include 'Visionneuse PSSM', 'Intégrateur phénotype-génotype (PheGenI)', 'ProSplign', and 'Passerelle des utilisateurs avancés de PubChem (PUG)'.

Figure 2.3. L'outil Primer BLAST.

Deuxièmement, on a copié et collé notre amorce d'intérêt (exon 2) dans le rimer BLAST, supprimé les intervalles indésirables entre les nucléotides et déterminer la séquence de l'amorce sens et anti sens.

Pour remplir les cases des amorces sens, on sélectionne du début de la séquence encadrée jusqu'au début de l'exon 2 puis, on clique sur réversion (dans le document Word) ensuite, 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 2 (Figure 2.4 ; 2.5).



U.S. National Library of Medicine | NCBI National Center for Biotechnology Information | Sign in to NCBI

Primer-BLAST

A tool for finding specific primers

Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST).

PCR Template | [Reset page](#) | [Save search parameters](#) | [Retrieves recent results](#) | [Publication](#) | [Tips for finding specific primers](#)

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred) [Clear](#)

Range: From To

Forward primer: [Clear](#)

Reverse primer:

Or, upload FASTA file | [Choisir un fichier](#) | Aucun fichier choisi

Primer Parameters

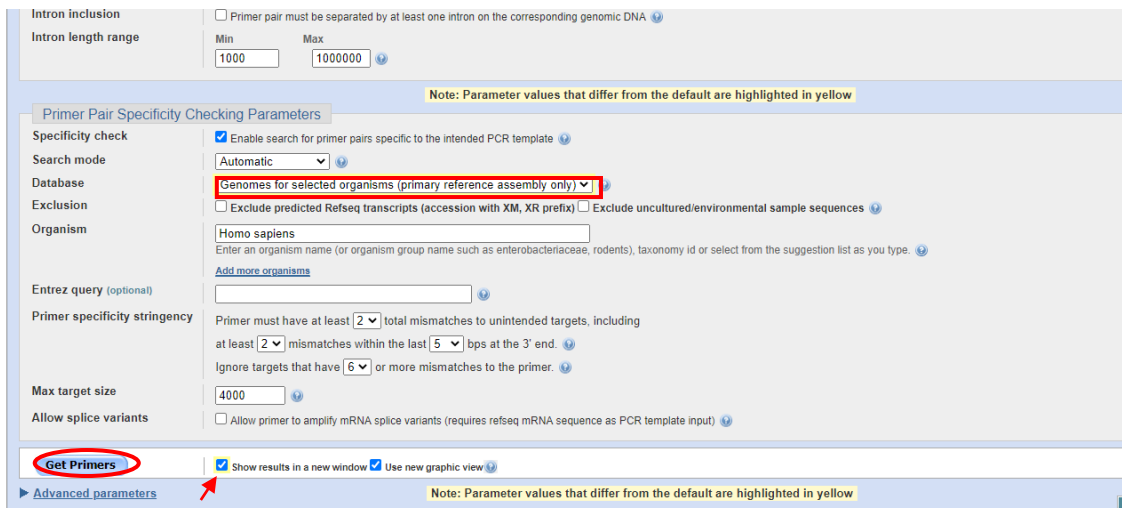
Use my own forward primer (5'->3' on plus strand) [Clear](#)

Use my own reverse primer (5'->3' on minus strand) [Clear](#)

PCR product size: Min Max

of primers to return:

Figure 2.4. Analyse de la séquence d'intérêt par le Primer BLAST.



Intron inclusion: Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA

Intron length range: Min Max

Primer Pair Specificity Checking Parameters | Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

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

Search mode:

Database: [Add more organisms](#)

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

Organism: Enter an organism name (or organism group name such as enterobacteriaceae, rodents), taxonomy id or select from the suggestion list as you type

Entrez query (optional):

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

Max target size:

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

Get Primers | Show results in a new window Use new graphic view

[Advanced parameters](#) | Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

Figure 2.5. L'obtention des résultats à travers le Primer BLAST.

2.5 Les caractéristiques d'une bonne amorce

- L'amorce spécifiée faudrait qu'elle contienne un nombre de bases inférieur à 1 000 car la PCR ne peut pas amplifier une séquence comportant plus de 1 000 bases.
- La teneur en GC doit avoisine les 40%.
- Les températures d'hybridation de l'amorce (sens et anti sens) doivent être équivalente des unes aux autres. Pendant la réalisation de la PCR, la température d'hybridation est stable à une seule valeur.
- Tous les produits aspécifiques résultants appartenant à l'amorce souhaitée doivent contenir plus des 1000 bases.

- Choisir le couple d'amorces qui donne le moins de produits aspécifiques, afin d'amplifier que le produit étudié.

Chapitre 3

3 Résultats et perspectives

3.1 Résultats de Primer BLAST	28
3.2 Interpretation des résultats	28
3.3 Confirmation des résultats	29

3.1 Résultats de la conception d'amorces pour le gène

Les résultats obtenus à partir l'outil de Primer BLAST sont présentées dans les (Figure 3.1) ci-dessous :

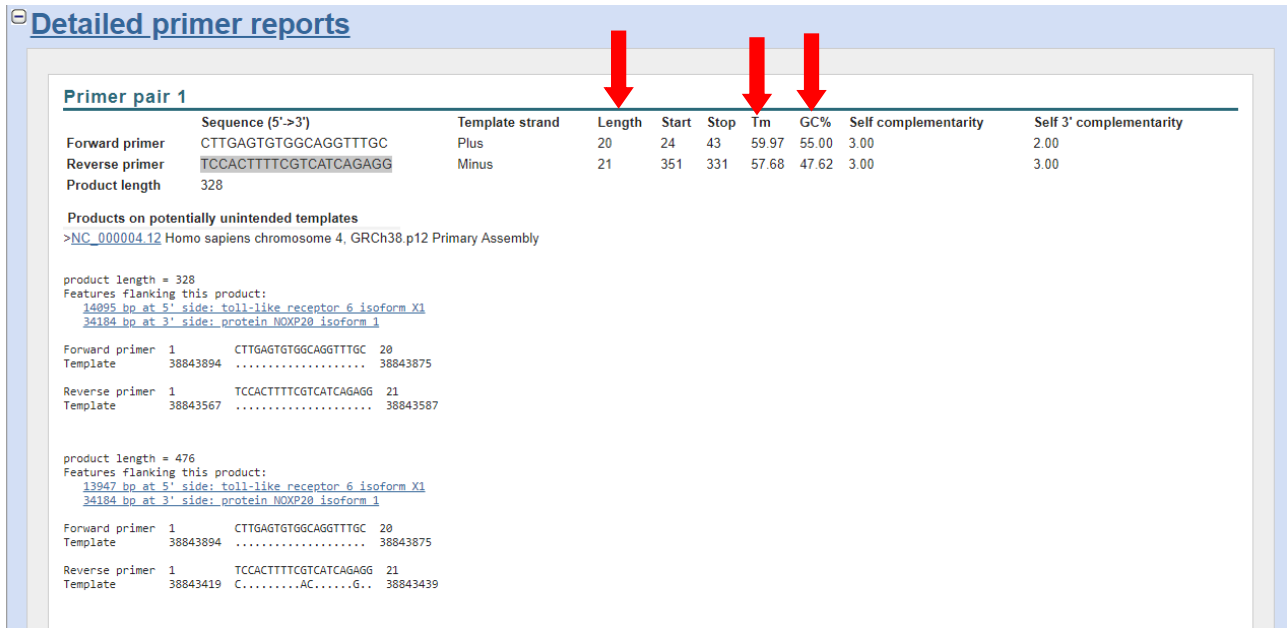


Figure 3.1. Résultat de Primer BLAST.

3.2 Interpretation des résultats

Premièrement, nous avons utilisé le site Ensembl pour découvrir l'intégrité du gène TLR6 qui contient 3 exons.

Deuxièmement, à l'aide de la disponibilité des conditions idéales pour le site primer, nous avons choisi l'exon 2 pour obtenir l'amorce spécifique du gène TLR6. Après, nous avons obtenu 10 paires d'amorces spécifique du gène TLR6 (exon 2) par l'utilisation du programme Primer BLAST

On a choisi la paire d'amorce 1 grâce à la présence des critères mentionnés précédemment :

Critères d'une bonne amorce	Taux optimal	Notre amorce
Température de fusion	52 à 58°C	Directe 59,79 Inverse 57,68
Longueur	15 à 30 nucléotides	Directe 20 nucléotides Inverse 21 nucléotides
Teneur en CG	40 à 60%	Directe 55% Inverse 47%
Amorces spécifiques	- de 1000 pb	328 pb
Produits aspécifiques	+ de 2000 pb	Tous + 1000 pb

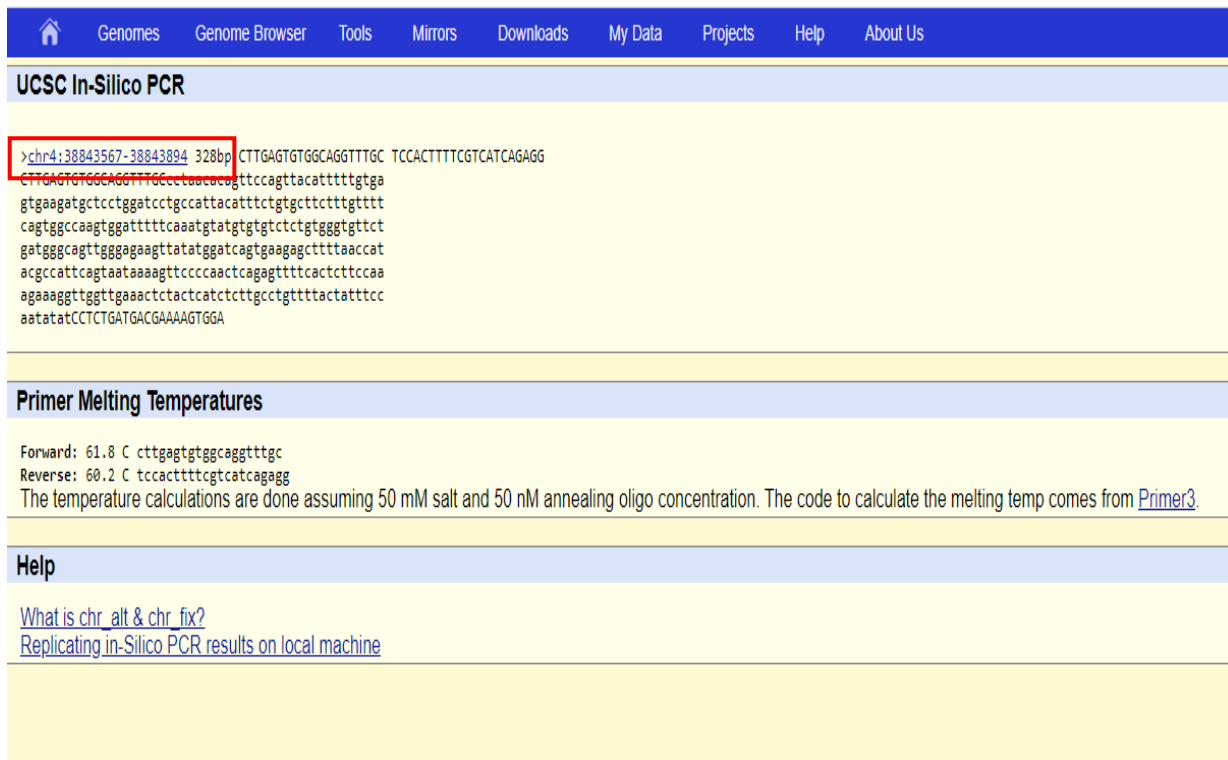
Nos résultats possèdent les principales caractéristiques et considérations pour le choix de cette paire d'amorces mais ça reste insuffisant. De cela, nous avons soumis les séquences d'amorces à un test de confirmation au site USCS un Silico PCR.

3.3 Confirmation des résultats

La dernière étape de notre travail est la confirmation des résultats qui se fait par le logiciel « PCR In Silicon » via le site <https://genome.ucsc.edu/> La recherche renvoie le fichier représenté (Figure 3.2).

Les résultats de cette confirmation nous a donné l'emplacement de notre produit spécifique sur le chromosome 4 et la longueur du gène qui est de 328 pb.

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



The screenshot displays the UCSC In-Silico PCR tool interface. At the top, there is a navigation bar with links for Genomes, Genome Browser, Tools, Mirrors, Downloads, My Data, Projects, Help, and About Us. Below this, the page title is "UCSC In-Silico PCR". The main content area shows a search result for a specific genomic region: ">chr4:38843567-38843894 328bp". This text is highlighted with a red box. Below the search result, the DNA sequence is displayed in a monospaced font, with the forward primer sequence (CTTGAGTGTGGCAGGTTTGC) and the reverse primer sequence (TCCACTTTTCGTCATCAGAGG) clearly visible. The sequence is followed by a section titled "Primer Melting Temperatures" which provides the melting temperatures for the forward (61.8 C) and reverse (60.2 C) primers. Below this, there is a "Help" section with links for "What is chr_alt & chr_fix?" and "Replicating in-Silico PCR results on local machine".

Figure 3.2. Confirmation des résultats par le logiciel PCR In Silicon

Chapitre 4

4 Conclusion

Les récepteurs Toll- like (TLR) détectent une large variété de micro-organismes, sont exprimées sur les cellules de l'immunité inné comme les macrophages. Les TLR jouent un rôle essentiel contre les envahisseurs pathologiques pour initier des défenses immunitaires innées par la médiation de la production des cytokines pro-inflammatoires. Le TLR6 est important pour initier certaines réponses antimicrobiennes

Un dérèglement de l'expression des TLR6 des macrophages ou un défaut de la voie de signalisation au sein de cette cellule est corrélées à l'apparition de diverses maladies inflammatoires auto-immuns (sclérose en plaques) et à la susceptibilité au cancer (cancer colorectal).

Pour mieux comprendre la contribution des réponses immunopathologiques liées au TLR6 dans l'auto-immunité et les réponses inflammatoires chroniques.

Il serait donc nécessaire de concevoir des amorces du TLR6 avec une amplification optimale par PCR pourrait fournir à l'avenir une thérapie utile qui cible la bonne intervention pour la prévention des maladies auto-immunes et des cancers.

Chapitre 5

5 Bibliographies

A

Almeida, L.A. de, Macedo, G.C., Marinho, F.A.V., Gomes, M.T.R., Corsetti, P.P., Silva, A.M., Cassataro, J., Giambartolomei, G.H., and Oliveira, S.C. (2013). Toll-Like Receptor 6 Plays an Important Role in Host Innate Resistance to *Brucella abortus* Infection in Mice. *Infection and Immunity* 81, 1654–1662.

Arias-Loste, M.T., Iruzubieta, P., Puente, Á., Ramos, D., Santa Cruz, C., Estébanez, Á., Llerena, S., Alonso-Martín, C., San Segundo, D., Álvarez, L., et al. (2016). Increased Expression Profile and Functionality of TLR6 in Peripheral Blood Mononuclear Cells and Hepatocytes of Morbidly Obese Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci* 17.

B

BELAID, N. (2017). Elaboration d'amorces pour le gène de la Glutathion peroxydas 3 GPx3. UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEN.

C

Cavaillon, J.-M. (2011). The historical milestones in the understanding of leukocyte biology initiated by Elie Metchnikoff. *Journal of Leukocyte Biology* 90, 413–424.

CHANG, H., CAO, Y., LIN, Y., ZHU, H., FU, Y., CHEN, X., and ZHANG, Q. (2015). Association between toll-like receptor 6 expression and auxiliary T cells in the peripheral blood of pediatric patients with allergic purpura. *Exp Ther Med* 10, 1536–1540.

Chávez-Galán, L., Olleros, M.L., Vesin, D., and Garcia, I. (2015). Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169+ and TCR+ Macrophages. *Front Immunol* 6.

Chen, J., Ng, M.M.-L., and Chu, J.J.H. (2015). Activation of TLR2 and TLR6 by Dengue NS1 Protein and Its Implications in the Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection. *PLoS Pathog* 11.

Chistiakov, D.A., Bobryshev, Y.V., Nikiforov, N.G., Elizova, N.V., Sobenin, I.A., and Orekhov, A.N. (2015). Macrophage phenotypic plasticity in atherosclerosis: The associated features and the peculiarities of the expression of inflammatory genes. *Int. J. Cardiol.* 184, 436–445.

D

Delneste, Y., Beauvillain, C., and Jeannin, P. (2007a). Immunité naturelle - Structure et fonction des Toll-like receptors. *Med Sci (Paris)* 23, 67–74.

Delneste, Y., Beauvillain, C., and Jeannin, P. (2007b). Immunité naturelle - Structure et fonction des Toll-like receptors. *Med Sci (Paris)* 23, 67–74.

Doyle, S.E., O'Connell, R.M., Miranda, G.A., Vaidya, S.A., Chow, E.K., Liu, P.T., Suzuki, S., Suzuki, N., Modlin, R.L., Yeh, W.-C., et al. (2004). Toll-like Receptors Induce a Phagocytic Gene Program through p38. *J Exp Med* 199, 81–90.

F

Funes, S.C., Rios, M., Escobar-Vera, J., and Kalergis, A.M. (2018). Implications of macrophage polarization in autoimmunity. *Immunology* 154, 186–195.

G

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

Gordon, S., and Plüddemann, A. (2017). Tissue macrophages: heterogeneity and functions. *BMC Biol* 15, 1–18.

J

Jafarzadeh, A., Nemati, M., Khorramdelazad, H., and Mirshafiey, A. (2019). The Toll-like Receptor 2 (TLR2)-related Immunopathological Responses in the Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology* 230–250.

K

Kim, J., Shimizu, C., Kingsmore, S.F., Veeraraghavan, N., Levy, E., Ribeiro dos Santos, A.M., Yang, H., Flatley, J., Hoang, L.T., Hibberd, M.L., et al. (2017). Whole genome sequencing of an African American family highlights toll like receptor 6 variants in Kawasaki disease susceptibility. *PLoS One* 12.

Kim, J.-H., Kordahi, M.C., Chac, D., and DePaolo, R.W. (2020). Toll-like Receptor-6 Signaling Prevents Inflammation and Impacts Composition of the Microbiota During Inflammation-Induced Colorectal Cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 13, 25–40.

L

Lorenz, T.C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *JoVE* 3998.

M

Marinho, F.A.V., de Paula, R.R., Mendes, A.C., de Almeida, L.A., Gomes, M.T.R., Carvalho, N.B., Oliveira, F.S., Caliar, M.V., and Oliveira, S.C. (2013). Toll-like receptor 6 senses Mycobacterium avium and is required for efficient control of mycobacterial infection. *European Journal of Immunology* 43, 2373–2385.

Martinez, F.O., and Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 6.

Mukherjee, S., Huda, S., and Babu, S.P.S. (2019). Toll-like receptor polymorphism in host immune response to infectious diseases: A review. *Scandinavian Journal of Immunology* 90, e12771.

P

Pandey, S.P., Chandel, H.S., Srivastava, S., Selvaraj, S., Jha, M.K., Shukla, D., Ebensen, T., Guzman, C.A., and Saha, B. (2014). Pegylated Bisacycloxypropylcysteine, a Diacylated Lipopeptide Ligand of TLR6, Plays a Host-Protective Role against Experimental Leishmania major Infection. *The Journal of Immunology* 193, 3632–3643.

R

Ren, C., Zhang, Q., de Haan, B.J., Zhang, H., Faas, M.M., and de Vos, P. (2016). Identification of TLR2/TLR6 signalling lactic acid bacteria for supporting immune regulation. *Sci Rep* 6.

Rk, S., S, S., F, F., Kb, M., Gt, H., Ha, E., and N, A. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia (Science).

S

Satta, N., Kruithof, E.K., Reber, G., and Moerlose, P. de (2008). Mécanismes d'activation cellulaire par les anticorps antiphospholipides. *Hématologie* 14, 354–365.

Semlali, A., Almutairi, M., Pathan, A.A.K., Azzi, A., Parine, N.R., AlAmri, A., Arafah, M., Aljebreen, A.M., alharbi, O., Almadi, M.A., et al. (2019a). Toll-like receptor 6 expression, sequence variants, and their association with colorectal cancer risk. *J Cancer* 10, 2969–2981.

Semlali, A., Almutairi, M., Pathan, A.A.K., Azzi, A., Parine, N.R., AlAmri, A., Arafah, M., Aljebreen, A.M., Alharbi, O., Almadi, M.A., et al. (2019b). Toll-like receptor 6 expression, sequence variants, and their association with colorectal cancer risk. *J Cancer* 10, 2969–2981.

Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S.-A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J.T., and Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology* 233, 6425–6440.

Shcheblyakov, D.V., Logunov, D.Y., Tukhvatulin, A.I., Shmarov, M.M., Naroditsky, B.S., and Gintsburg, A.L. (2010). Toll-Like Receptors (TLRs): The Role in Tumor Progression. *Acta Naturae* 2, 21–29.

Sprangers, S., Vries, T.J. de, and Everts, V. (2016). *Monocyte Heterogeneity: Consequences for Monocyte-Derived Immune Cells* (Hindawi).

T

Tantisira, K., Klimecki, W.T., Lazarus, R., Palmer, L.J., Raby, B.A., Kwiatkowski, D.J., Silverman, E., Vercelli, D., Martinez, F.D., and Weiss, S.T. (2004). Toll-like receptor 6 gene (TLR6): single-nucleotide polymorphism frequencies and preliminary association with the diagnosis of asthma. *Genes Immun.* 5, 343–346.

V

Varol, C., Mildner, A., and Jung, S. (2015). Macrophages: Development and Tissue Specialization. *Annual Review of Immunology* 33, 643–675.