

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

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

Département de Biologie

Laboratoire de biologie moléculaire appliquée et d'immunologie W0414100

(BIOMOLIM)

MEMOIRE

Présenté par

SEDJAI Yasmine
Pour l'obtention du

Grade de MASTER

En Immunologie

Thème

STAT4 et profil du macrophage M1 classiquement activé, proinflammatoire/tueur

Sous la direction du Professeur Mourad ARIBI

Soutenu le 20/09/2020

Devant le jury :

Pr. SMAHI M C I	Professeur	Université de Tlemcen	Président
Dr. Mourad Aribi	Professeur	Université de Tlemcen	Dir. de thèse
Dr. Nabila Brahami	Maître de Conférences A	Université de Tlemcen	Examinatrice

20 Septembre 2020

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

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

Département de Biologie

Laboratoire de biologie moléculaire appliquée et d'immunologie W0414100

(BIOMOLIM)

MEMOIRE

Présenté par

SEDJAI Yasmine
Pour l'obtention du

Grade de MASTER

En Immunologie

Thème

STAT4 et profil du macrophage M1 classiquement activé, proinflammatoire/tueur

Sous la direction du Professeur Mourad ARIBI

Soutenu le 20/09/2020

Devant le jury :

Pr. SMAHI M C I	Professeur	Université de Tlemcen	Président
Dr. Mourad Aribi	Professeur	Université de Tlemcen	Dir. de thèse
Dr. Nabila Brahami	Maître de Conférences A	Université de Tlemcen	Examinatrice

20 Septembre 2020

Avant- propos

Face à la «crise sanitaire mondiale majeure de notre époque», nous n'avons pas eu l'occasion d'assurer des travaux au laboratoire, la cause pour laquelle nous nous sommes dirigés vers un travail d'immunoinformatique, dans lequel nous avons jugé intéressant de concevoir des amorces d'un gène spécifiques, pour des fins d'amplification génétique.

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et d'Immunologie (BIOMOLIM), Université de Tlemcen, sous la direction du Professeur ARIBI Mourad à qui je suis très reconnaissante ; son expérience, son expertise, ses relations, sa disponibilité, son aide précieuse, ainsi que ses interventions m'ont été fortement utiles, son accompagnement m'a permis de préparer au mieux mon travail dont le sujet est d'actualité ; je tiens donc à lui témoigner mes vifs remerciements de m'avoir redonné l'envie d'aller plus loin, l'avoir comme encadreur est un privilège pour moi.

En guise de reconnaissance, je remercie également mes chers parents et mon frère pour tout le soutien, la patience, l'amour et la tendresse qu'ils m'ont accordée, mes chères amies Abir et Rayene ainsi que toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce modeste travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement Dr NOUARI Wafa, maître de conférences classe B pour son soutien, sa disponibilité, son enthousiasme, sa gentillesse et sa patience tout au long de mon parcours en immunologie.

Mes remerciements s'adressent également à l'Ingénieures du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et d'Immunologie Mme Rabiaa Messali et Hadjidj Zaineb, pour leur générosité.

Finalement, j'exprime toute ma gratitude aux membres de jury pour leur présence et l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Je dédie cette thèse

À MES CHERS PARENTS,

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

A mon chère frère Mohamed, que j'aime profondément, mon meilleur ami, En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je te souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, te protège et te garde.

A mes liens aimés, mes chères BENZOUEOU Abir et TAA'YAT Rayene, En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.

Résumé

Introduction : La défense immune contre les agents infectieux repose sur le bon fonctionnement du système immunitaire (SI) ; composé de diverses cellules, y compris les macrophages (MØ), impliqués dans l'inflammation et l'homéostasie tissulaire.

Leur plasticité est nécessaire à leur changement phénotypique lorsqu'ils sont issus de monocytes (MO) sanguins en inflammation, où le profil classiquement activé (M1) assure l'immunité cellulaire suite à l'action des agents pathogènes *via* le transducteur de signal et l'activateur de transcription 4 (STAT4), activé principalement par l'interleukine-12 (IL-12), conduisant à l'expression de gènes cibles, notamment ceux codants l'interféron-gamma (IFN- γ).

Le polymorphisme du gène *STAT4* peut être associé à de nombreuses anomalies impliquant les MØ M1 ; l'étude de son expression s'est avérée dans ce cas cruciale pour la mise en évidence de ces pathologies, et nécessite donc la réalisation d'une PCR de ce gène.

Objectif : Conception des amorces du gène *STAT4*.

Matériel et méthodes : J'ai mené un travail d'immunoinformatique, dans lequel j'ai utilisé en premier lieu le moteur de recherche de données bibliographiques PubMed, afin de choisir le gène *STAT4* pour concevoir ses amorces en utilisant l'outil Primer-Blast appartenant à la même base, afin d'obtenir diverses propositions de paires d'amorces appropriées.

En deuxième lieu, j'ai pris la séquence du gène *STAT4* à partir de la plateforme Ensembl.org, afin de concevoir ses amorces par Primer-Blast en passant par le Word.

Résultats : L'outil Primer-Blast m'a permis d'obtenir deux couples d'amorces spécifiques au gène *STAT4*, qui répondent aux critères d'une meilleure paire nécessaire au bon fonctionnement d'une PCR, une première (amorce sens (AGTTATTTTCTTTGGAGGGTGTGA, 25pb, 58°C, et 36%GC), amorce anti-sens (TGGGCAGTTGTGTCAGGTTT, 20pb, 60°C, et 50%GC)), et une deuxième (amorce sens (CTTGGTCACCTCACTGGGTC, 20pb, 59°C, et 60%GC), amorce anti-sens (GCTAACACGCAGAACTGCC, 20pb, 60°C, et 55%GC)). Afin de vérifier leur fiabilité, j'ai réalisé une PCR virtuelle en allant sur *in-silico* PCR.

Discussion : A l'aide des outils de la bioinformatique, j'ai pu réussir la conception de deux paires d'amorces spécifiques au gène *STAT4*, ayant l'avantage d'être stables avec des propriétés adaptées aux protocoles expérimentaux comme la PCR.

Conclusions et perspectives : J'ai pu élaborer deux paires d'amorces spécifiques au gène *STAT4* en utilisant deux méthodes différentes. D'autres techniques peuvent être appliquées pour des fins similaires, notamment Primer-3.

Cela pourrait faire l'objet dans l'avenir d'application de *STAT4* dans le phénotypage des activités fonctionnelles des macrophages M1 dans différentes pathologies.

Mots clés : Macrophage proinflammatoire- *STAT4*- PCR- amorces.

Abstract

Background : Immune defense against infectious agents is based on the proper functioning of the immune system (IS); composed of various cells, including macrophages (MØ), involved in inflammation and tissue homeostasis.. Their plasticity is necessary for their phenotypic change when they are derived from blood monocytes (MO) in inflammation, where the profile classically activated (M1) provides cellular immunity following the action of pathogens via signal transducer and transcription activator 4 (STAT4), activated primarily by interleukin-12 (IL-12), leading to the expression of target genes, including interferon-gamma-encoding genes (IFN-γ).

The polymorphism of the STAT4 gene can be associated with numerous abnormalities involving MØ M1; the study of its expression has proved crucial in this case for the identification of these pathologies, and therefore requires the realization of a PCR of this gene.

Objective: Design of STAT4 gene primers.

Materials and methods: I carried out an immunoinformatics work, in which I first used the PubMed bibliographic data search engine, in order to choose the STAT4 gene to design its primers using the tool Primer-Blast belonging to the same base, in order to obtain various proposals for appropriate primer pairs.

Second, I took the sequence of the STAT4 gene from the Ensembl.org platform, in order to design its primers by Primer-Blast through Word.

Results: The Primer-Blast tool allowed me to obtain two pairs of primers specific to the *STAT4* gene, which meet the criteria of a better pair necessary for the proper functioning of a PCR, first (forward primer (AGTTATTTTCTTTGGAGGGTTGA, 25pb, 58°C, and 36%GC), reverse primer (TGGGCAGTTGTCAGGTGTGTGTGTTT, 20pb, 60°C, and 50%GC)), and second (forward primer (CTTGGTCACCTCACTGGGTC, 20pb, 59°C, and 60%GC), reverse primer (GCTAACACGCAGAACTGCC, 20pb, 60°C, and 55%GC)). In order to check their reliability, I made a virtual PCR by going on *in-silico* PCR.

Discussion: Using the tools of bioinformatics, I was able to successfully design two pairs of primers specific to the *STAT4* gene, having the advantage of being stable with properties adapted to experimental protocols such as PCR.

Conclusions and perspectives: I was able to develop two pairs of primers specific to the *STAT4* gene using two different methods. Other techniques may be used for similar purposes, such as Primer-3.

This could be the subject in the future of application of STAT4 in the phenotyping of functional activities of M1 macrophages in different pathologies.

Keywords: Proinflammatory macrophage- STAT4- PCR- primers

ملخص

مقدمة: تعتمد الحماية ضد العوامل المعدية على الأداء السليم للجهاز المناعي (SI)؛ وتتكون من خلايا مختلفة، بما في ذلك الضامة (MØ) ، والتي تعمل على التهاب و الاتزان الداخلي للأنسجة.

إن مرونة هذه الخلايا ضرورية لتغيير نمطها الظاهري عندما تكون مشتقة من الخلايا البلازمية في الدم (MO) في التهاب، حيث يوفر ملف التعريف النمط الكلاسيكي النشط (M1) مناعة خلوية بعد إجراء الكائنات المسببة للمرض عبر محوالات الإشارة وتنشيط النسخ 4(STAT4) ، والذي يتم تنشيطه في الأساس بواسطة إنترلوكين 12(IL-12) ، يؤدي إلى التعبير عن الجينات المستهدفة، بما في ذلك الجينات التي تعمل بترميز الإنترفيرون جاما.(IFN- γ)

يمكن ربط تعدد الأشكال للجين *STAT4* بالعديد من التشوهات التي تشمل *M1 MØ* ؛ وقد أثبتت دراسة التعبير عنه أهمية حاسمة في هذه الحالة لتحديد هذه الأمراض، وبالتالي فإنها تتطلب تحقيق PCR لهذا الجين.

الهدف: تصميم البادئات لجين *STAT4*

المواد والأساليب: قمت بعمل معلوماتي مناعي، استخدمت فيه لأول مرة محرك البحث البيولوجي PubMed ، من أجل اختيار الجين *STAT4* لتصميم البادئات باستخدام أداة Primer-Blast التي تنتمي إلى نفس القاعدة، من أجل الحصول على اقتراحات مختلفة لأزواج البادئات المناسبة

ثانياً، أخذت تسلسل الجين *STAT4* من منصة Ensembl.org ، من أجل تصميم البادئات من قبل Primer-Blast **النتائج:** سمحت لي أداة Primer-Blast بالحصول على زوجين من البادئات الخاصة بالجين *STAT4* ، والتي نفي بمعايير الزوج الأفضل اللازم لحسن عمل PCR ، الزوج الأول () (AGTTATTTTCTTGAGGGTGTGGA ، 25pb ، 58 درجة مئوية، و 36% GC) ، (TGGGCAGTTGTGTCAGGTTT ، 20pb ، 60 درجة مئوية ، و 50% GC) . الزوج الثاني () (CTTGTACCTCACTGGGTC ، 20pb ، 59 درجة مئوية ، و 60% GC) ، (GCTAACACGCAGAACTGCC ، 20pb ، 60 درجة مئوية ، و 55% GC) . من أجل التحقق من موثوقيتها، قمت بإجراء PCR افتراضي من خلال إجراء *In-Silico PCR*

المناقشة: باستخدام أدوات المعلوماتية الحيوية، تمكنت من تصميم زوجين من البادئات الخاصة بالجين *STAT4* بنجاح، مع الاستفادة من الاستقرار في الخصائص التي تم تكييفها مع البروتوكولات التجريبية مثل PCR.

الاستنتاجات ووجهات النظر: كنت قادرة على تطوير زوجين من البادئات الخاصة بالجين *STAT4* باستخدام طريقتين مختلفتين. ويمكن استخدام تقنيات أخرى لأغراض مماثلة، مثل Primer-3.

ويمكن أن يكون هذا الموضوع في المستقبل من تطبيق *STAT4* في الطرز الظاهرية للأنشطة الوظيفية للضامة M1 في مختلف الأمراض.

الكلمات المفتاحية: الضامة المسببة للالتهابات- *STAT4* -PCR- البادئات

Table des matières

Avant-propos.....	IV
Résumé.....	V
Abstract.....	VI
ملخص.....	VII
Table des matières.....	VIII
Liste des figures.....	IX
Liste des tableaux	X
Liste des abréviations.....	XI
Introduction	1
Chapitre1. Revue de la littérature	3
1.1 Cellules souches hématopoïétiques	3
1.1.1 Ontogénie	3
1.2 Macrophage	4
1.2.1 Ontogénie	4
1.2.2 Définition.....	5
1.2.3 Fonctions.....	6
1.2.4 Polarisation	7
1.2.4.1 Régulation de la polarisation des macrophages.....	7
1.2.4.2 Macrophages classiquement activés	8
1.2.4.3 Macrophages alternativement activés	8
1.3 M1 et profil proinflammatoire.....	10
1.3.1 M1 en infection et en inflammation.....	10
A. Macrophage M1 en infection.....	10
B. Macrophage M1 en inflammation.....	11
1.3.2 Macrophages classiquement activés et pathologies.....	11
A. Macrophages M1 et maladies inflammatoires.....	11
B. Macrophages M1 et lésions tissulaires.....	13
C. Macrophages M1 et cancer.....	13
1.4 Famille STAT.....	13
1.4.1 Structure protéique.....	15
1.4.2 STAT4.....	17
1.4.3 Gène <i>STAT4</i>	17
1.4.4 Signalisation STAT4.....	17
1.4.5 Rôles des STAT4.....	18
A. Rôles positifs des STAT4.....	18

B. Rôles négatifs des STAT4.....	19
1.4.6 Protéine STAT4 et macrophage M1.....	20
1.4.7 Variants SNPs du gène <i>STAT4</i> associés au profil proinflammatoire.....	21
1.5 réaction de polymérisation en chaîne	23
1.5.1 Principe.....	23
1.5.2 Applications.....	23
1.5.3 Acteurs de la PCR.....	23
1.5.4 Etapes de la PCR.....	24
1.5.5 Analyse des produits PCR.....	25
1.5.6 Choix d'amorces	26
Chapitre 2. Matériel et méthodes.....	28
2.1 Critères d'une bonne paire d'amorces.....	28
2.2 Conception d'amorces.....	29
Chapitre 3. Résultats.....	32
3.1 Résultats de la conception d'amorces.....	32
3.2 Confirmation des résultats.....	33
Chapitre 4. Discussion	35
Chapitre 5. Conclusions et perspectives.....	36
Chapitre 6. Bibliographie.....	37

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.1. Ontogénie des CSH
- Figure 1.2. Origine hématopoïétique des macrophages
- Figure 1.3. Impact de la polarisation des macrophages sur le profil de libération des cytokines
- Figure 1.4. Macrophages classiquement activés et profil proinflammatoire
- Figure 1.5. Démonstration de la localisation des protéines STATs en réponse à la cytokine de signalisation
- Figure 1.6. Voie de signalisation JAK/STAT
- Figure 1.7. Structure protéique des STATs
- Figure 1.8. Structure du gène *STAT4*
- Figure 1.9. Voie de signalisation IL-2/STAT4
- Figure 1.10. Initiation de l'inflammation dans les tissus adipeux
- Figure 1.11. Les étapes de la technique d'amplification PCR
- Figure 1.12. Visualisation des produits de PCR sur un gel d'agarose
- Figure 2.1. Etapes de sélection des amorces sens et anti-sens par l'utilisation de PubMed et Primer-Blast
- Figure 2.2. Etapes de sélection des amorces sens et anti-sens par l'utilisation d'Ensembl.org, PubMed et Primer-Blast
- Figure 3.1. Résultats de la conception d'amorces sens et anti-sens par l'utilisation de PubMed et Primer-Blast
- Figure 3.2. Résultats de la conception d'amorces sens et anti-sens par l'utilisation d'Ensembl.org, PubMed et Primer-Blast
- Figure 3.3. Etapes de confirmation des résultats
- Figure 3.4. Confirmation de la fiabilité des amorces obtenues par l'utilisation de PubMed et Primer-Blast
- Figure 3.5. Confirmation de la fiabilité des amorces obtenues par l'utilisation d'Ensembl.org, PubMed et Primer-Blast
- .

LISTE DE TABLEAUX

Tableau 1.1. Source du macrophage dans les tissus et les fluides

Tableau 1.2. Transcriptomes spécifiques aux macrophages M1 et M2 *in vivo* et *in vitro*

Tableau 1.3. Caractéristiques des SNPs du gène *STAT4*

LISTE DES ABREVIATIONS

CSH :	cellule souche hématopoïétique
SI :	système immunitaire
CD :	cluster de différenciation
CMH I/II :	molécule d'histocompatibilité classe I/II
LT :	lymphocyte T
BM :	moelle osseuse
M1 :	macrophage classiquement activé
M2 :	macrophage alternativement activé
ROS :	espèces réactives d'oxygène
NO :	oxyde nitrique
TAM :	macrophages associés aux tumeurs
VIH :	virus de l'immunodéficience humaine
DT2 :	diabète de type 2
PR :	polyarthrite rhumatoïde
SEP :	sclérose en plaque
ACE2 :	enzyme de conversion de l'angiotensine 2
STAT :	transducteur de signal et activateur de transcription
GAS :	sites Gamma-activés
TF :	facteur de transcription
DC :	cellule dendritique
NK :	natural Killer
CPA :	cellule présentatrice d'antigène
LED :	lupus Erythémateux Disséminé
VHB :	virus de l'hépatite B
CHC :	carcinome hépatocellulaire chronique
SS :	syndrome de Sjögren
SDRA :	syndrome de détresse respiratoire aigue
JAK :	janus kinase
MØ :	macrophage

Introduction

La défense immune contre les agents infectieux, ainsi que l'élimination des cellules cancéreuses ou anormales repose sur le bon fonctionnement du système immunitaire, composé lui-même de diverses cellules (Van Laethem et *al.*, 2014), dont les macrophages, identifiés pour la première fois par Metchnikoff.

Les macrophages sont parmi les acteurs principaux de l'immunité innée, de la réponse inflammatoire et de l'homéostasie tissulaire. Ils sont répartis dans tout l'organisme où ils assurent des réponses immunes variées, mais ils participent aussi à des processus physiologiques importants. Ils sont également impliqués dans l'étiopathogénie de plusieurs désordres métaboliques et immunométaboliques. Leur capacité à participer dans l'induction de la réponse immune adaptative est médiée essentiellement grâce à leur habileté à présenter l'antigène aux cellules T.

Les macrophages peuvent être de deux origines : ou bien d'origine embryonnaire, constituant un groupe de macrophages résidents tissulaires, ou bien hématopoïétique, où ils dérivent à partir des monocytes circulants. Ils se différencient en cellules pro- ou anti-inflammatoires, dépendant de la nature des facteurs qui les stimulent (Dalmas and Venteclef, 2015), et par conséquent du microenvironnement où ils se trouvent.

Les macrophages classiquement activés assurent l'immunité cellulaire et produisent des cytokines proinflammatoires. Là, il faudra rappeler à titre d'information qu'ils sont impliqués au premier plan dans l'hyperinflammation et la pyroptose au cours de la maladie COVID-19 (Tay et *al.*, 2020), sachant qu'ils sont parmi les cellules cibles principales de l'infection par le virus SARS-CoV-2 (Merad and Martin, 2020). En effet, il a bien été montré que la persistance de leur activité peut contribuer à une inflammation chronique, pouvant donner naissance à des maladies inflammatoires, des lésions tissulaires et des cancers (Chen et *al.*, 2018).

Fait important, la polarisation vers un phénotype proinflammatoire fait appel à de nombreux gènes ou loci, y compris le gène *STAT4* situé sur le chromosome 2q33, dont la mutation est associée à un polymorphisme ou à un effet pathogène. Le gène *STAT4* présente donc différents variants de modifications ponctuelles (*single nucleotide polymorphism*, SNP), avec des caractéristiques distinctes.

Récemment, les variants rs (*reference SNPs*) 7582694 (rs7582694) et rs7574865 du gène *STAT4* ont été montrés pour être systématiquement associés à un risque de développer la sclérose en plaque (SEP) et l'infection chronique par le virus de l'hépatite B (VHB) dans la population Egyptienne et asiatique, respectivement.

Aussi, l'étude de l'expression de la voie de signalisation STAT4 s'est avérée cruciale dans la mise en évidence d'importantes anomalies de la réponse immunitaire impliquant un défaut ou une forte polarisation vers les macrophages M1. Dans ce contexte, l'objectif spécifique de ce travail de Master a été axé sur la conception des amorces du gène *STAT4*.

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.1 Cellules souches hématopoïétiques

1.1.1 Ontogénie

La reconstitution continue des cellules sanguines le long de la vie d'un organisme porte le nom d'hématopoïèse, un processus avec un système hautement réglementé dont les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont au sommet de la hiérarchie (figure 1.1) (Pinho and Frenette, 2019).

Leur histoire remonte aux années 1950, où les chercheurs ont pu démontrer le rétablissement de la production de cellules sanguines chez des souris irradiées, à qui on a injecté des cellules de la moelle osseuse par voie intraveineuse (Eaves, 2015).

Ce sont des cellules multipotentes exprimant le CD34, qui en dehors de leur quiescence, sont à l'origine de la régénération de toutes les lignées lymphoïdes et myéloïdes regroupant toutes les cellules sanguines humaines le long de la vie, afin de maintenir le SI (Lee et *al.*, 2019), suite à leur différenciation en passant par des progéniteurs et des précurseurs ; tandis que leur auto-renouvellement donne naissance à des CSH filles identiques afin de maintenir la taille de leur pool (Seita and Weissman, 2010).

Le contrôle de la maintenance et la régulation de leur activité est basé sur des interactions complexes de facteurs cellulaires intrinsèques, extrinsèques et épigénétiques, ainsi que sur la présence d'un microenvironnement spécifique appelé également une niche hématopoïétique; il s'agit bien d'une structure anatomique et fonctionnelle située au sein de la moelle osseuse chez l'adulte, et est composée de cellules mésenchymateuses, ostéoblastes...etc (Seita and Weissman, 2010). Les structures ou microdomaines dynamiques et fonctionnels membranaires connus sous le nom de radeaux lipidiques, sont aussi nécessaires à la mobilisation des CSH en activant la protéine Rac (Alomari et *al.*, 2019).

Tout comme le développement de maladies graves telles qu'une progression pré-leucémique en cas de déséquilibre de l'activité des CSH, le vieillissement hématopoïétique est aussi responsable de l'apparition de pathologies immunitaires, y compris l'anémie et l'auto-immunité (Lee et *al.*, 2019).

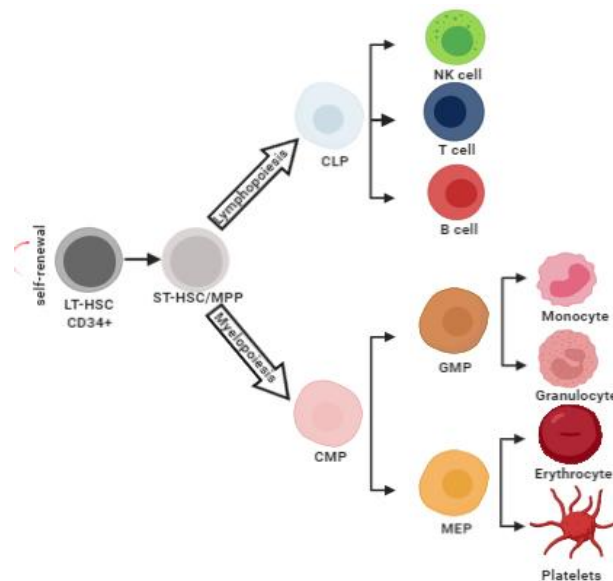


Figure 1.1. Ontogénie des CSH. Les CSH à long terme (LT-CSH) sont capables de s'auto-renouveler et sont responsables de la génération de cellules sanguines. CLP; le progéniteur lymphoïde commun, CMP; le progéniteur myéloïde commun, GMP; le progéniteur des macrophages granulocytaires et le MEP; le progéniteur mégacaryocytaire et érythroïde.

1.2 Macrophage

1.2.1 Ontogénie

Macro (grand), phage (mangeur); dont l'abréviation est MØ, sont des cellules appartenant aux leucocytes, constituent 4 à 10 % des cellules nucléées dans le sang périphérique d'un être humain en bonne santé (Shapouri-Moghaddam et al., 2018a), elles peuvent être des cellules résidentes portant des noms différents selon leur localisation (tableau 1.1), d'origine embryonnaires et sont régénérées par auto-renouvellement des cellules dérivées du fœtus, tandis que celles d'origine hématopoïétique sont reconstituées par des CSH après la naissance, et sont issues de monocytes sanguins en cas d'inflammation (figure 1.2) (McGrath et al., 2015).

Tableau 1.1. Source de macrophage dans les tissus et les fluides.

Emplacement	Types de cellules
OS	Ostéoclaste
Moelle osseuse	Pro-monocyte, macrophage
Système nerveux central	Cellule microgliale
Lamina propria, Rate, Thymus	Macrophage résidant

Foie	Cellule de Kupffer
Poumon	Macrophage alvéolaire
Sang périphérique	Monocyte
Peau	Cellule de Langerhans
Cavité péritonéale	Macrophage péritonéal

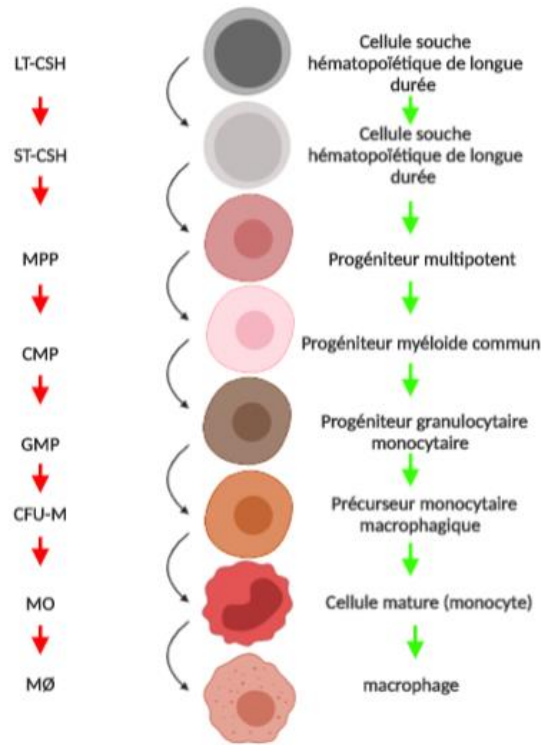


Figure 1.2. Ontogénie des macrophages. Les macrophages (MØ) sont issus de la différenciation des monocytes sanguins (MO) concomitante à leur passage tissulaire, suite à la différenciation des cellules souches hématopoïétiques de longue durée (LT-CSH), en celles de courte durée (ST-CSH), ces derniers donnent à leur tour des progéniteurs multipotents (MPP), myéloïdes communs (CMP), puis granulocytaires monocytaires (GMP), responsables de la production des précurseurs monocytaires macrophagiques (CFU-M).

1.2.2 Définition

Les réponses immunitaires innées et adaptatives se caractérisent par la présence des macrophages; considérés comme les composants essentiels de l'immunité, mais aussi comme la première ligne de défense contre les agents infectieux, y compris les bactéries et les virus en résidant dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes, afin d'éradiquer les microbes impliqués dans le développement de plusieurs pathologies dont le cancer et les maladies auto-immunes (Aribi, 2018). Ils sont également répartis dans tout l'organisme pour participer à ses processus physiologiques et pathologiques (Trouplin et *al.*, 2013).

Ce sont des cellules identifiées par Elie Metchnikoff grâce à leur nature phagocytaire, elles sont considérées comme des acteurs de l'immunité innée, de l'inflammation et de l'homéostasie tissulaire (Kielbassa et *al.*, 2019). Elles sont caractérisées par leur hétérogénéité phénotypique présentée par un système de capture sous forme de récepteurs différents, ainsi que par leur changement de profil pro ou anti-inflammatoire (Gordon and Martinez-Pomares, 2017), grâce à leur plasticité et grande diversité anatomique et fonctionnelle. Elles sont subdivisées en différents sous-ensembles fonctionnels. Cependant, ils peuvent contribuer à de nombreuses maladies, la cause pour laquelle elles sont ciblées thérapeutiquement (Wynn et *al.*, 2013).

1.2.3 Fonctions

Les macrophages sont présents dans tous les aspects biologiques d'un organisme avec des rôles distincts, ils participent au :

- Développement de l'organisme:
 - En permettant la sculpture des os, afin de former les cavités où l'hématopoïèse peut s'ensuivre pour prévenir l'apparition de l'ostéopétrose
 - En régulant l'angiogenèse au cours du développement de l'œil
 - En permettant le développement structurel normal du cerveau, suite à la signalisation CSF1R au niveau des microglies (Gordon and Martinez-Pomares, 2017).
- La régulation de l'homéostasie tissulaire et métabolique:
 - En répondant aux changements physiologiques et aux défis environnementaux, ainsi qu'aux rapports alimentaires (Wynn et *al.*, 2013), tels que le recyclage du Fer, dont la libération est dépendante de l'hème extrait de la phagocytose et la digestion des globules rouges endommagés, au niveau de la pulpe rouge et la moelle osseuse (Gordon and Martinez-Pomares, 2017).
- Processus d'autophagie:
 - Est un mécanisme physiologique de protection et de recyclage cellulaire, jouant un rôle dans la régulation de la polarisation des macrophages, ainsi que celle de ses fonctions phagocytotiques et inflammatoires, citons l'exemple de la protéine kinase AMP dépendante (AMPK), considérée comme un suppresseur de l'inflammation au niveau des macrophages, elle inhibe la voie mTOR en favorisant et induisant l'autophagie de ces cellules phagocytaires, augmentant ainsi la réponse anti-inflammatoire (Wu and Lu, 2019).
- L'inflammation et la régénération tissulaire:
 - Par le fait d'induire la réponse inflammatoire nécessaire à la destruction de l'agent causal, en réponse à une blessure, leur stimulation leur permettent de produire un ensemble de cytokines et chimiokines, conduisant par la suite à une vasodilatation et

une formation d'œdème, suivie du recrutement de neutrophiles vers le site enflammé par le phénomène de la diapédèse. L'inflammation est ensuite résolue par un réseau cellulaire dont des macrophages en fait partie, suite à la modification de leur activation qui induit leur synthèse d'interleukine-10 (IL-10) et du TGF- β , et leur expression de molécules immunosuppressives nécessaires à la réparation, la cicatrisation et la régénération des cellules épithéliales (Wynn and Vannella, 2016a).

- La thermogénèse:

Les macrophages sont essentiels pour l'adaptation à l'exposition au froid, qui conduit à la lipolyse dans les graisses blanches, et à la thermogénèse dans les graisses brunes (Gordon and Martinez-Pomares, 2017).

- L'activité microbicide:

Est la phagocytose ou l'internalisation des agents pathogènes afin de les détruire au niveau des phagolysosomes

- La présentation antigénique via les molécules d'histocompatibilité classe I ou II (CMHI/CMHII), aux cellules de l'immunité adaptative notamment les lymphocytes T (LT), suite à leur apprêtement, capture, endocytose et dégradation (Trouplin et *al.*, 2013).

- Burst respiratoire et production de cytokines pro et antiinflammatoires (Aribi, 2018).

1.2.4 Polarisation

La plasticité des macrophages leur permettent de passer d'un phénotype à un autre appelé également la polarisation; ce processus est orienté par les cytokines du milieu local, où se situent les macrophages caractérisés par l'expression des marqueurs de surface, la production de facteurs spécifiques, ainsi que la fonction biologique (Shapouri-Moghaddam et al., 2018b), la recherche sur ce phénomène remonte aux années 1962, où il a été défini comme l'activation des macrophages dans l'espace et dans le temps à un moment donné, l'inflammation est donc considérée comme étant le meilleur endroit pour discuter la polarisation de ces cellules immunomodulatrices (Murray, 2017).

En 1996, le concept Th1/Th2 a permis l'inspiration du modèle de polarisation des macrophages M1/M2 (Nahrendorf and Swirski, 2016).

1.2.4.1 Régulation de la polarisation des macrophages

Elle e fait par :

- Voies extrinsèques: se font *in vitro*, en cultivant des macrophages afin de les stimuler avec des agents polarisants M1 (IFN- γ + LPS), ou M2 (IL-4 et IL-13).
- Voies intrinsèques: sont basées sur deux sources du développement des macrophages, les progéniteurs embryonnaires et ceux de la moelle osseuse (BM).

- La survie des macrophages: le maintien de leur nombre dans le cas normal ou inflammatoire est assuré par deux cytokines de survie, notamment le CSF-1 et le GM-CSF.
- Voies épigénétiques

1.2.4.2 Macrophage classiquement activé

Appelés macrophages M1, sont des cellules qui assurent l'immunité cellulaire (Wu and Lu, 2019), elles agissent en exprimant le CXCL9 et CXCL10 nécessaires au recrutement des Th1, et en produisant des cytokines proinflammatoires telles que l'IL-1 β , IL-6 et le TNF α , via l'activation de STAT-4 suite à l'action du LPS seul ou associé aux cytokines de types Th1 (IFN- γ et GM-CSF), afin d'éliminer des agents pathogènes par la génération des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la production de l'oxyde nitrique (NO).

Elles sont responsables de la présentation antigénique via le CMH II, afin de promouvoir la réponse cytotoxique. Cependant, la persistance de leur activité peut contribuer à une inflammation chronique (Shapouri-Moghaddam et al., 2018b).

1.2.4.3 Macrophage alternativement activé

Appelés macrophages M2, sont des cellules qui assurent l'immunité humorale (Wu and Lu, 2019), elles agissent en exprimant le CCL-17,18 et 24 nécessaires au recrutement des Th2, et en produisant des cytokines antiinflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF- β , via l'activation du STAT-6 suite à l'action de l'IL-4 et l'IL-13 principalement, afin de résoudre l'inflammation et de conserver l'homéostasie tissulaire par l'hydrolyse de l'arginine.

Elles sont responsables de l'immunorégulation, la cicatrisation des plaies ainsi que la phagocytose des corps apoptotiques.

Elles sont divisées en 4 sous-ensembles; M2a exprimant fortement le CD206, M2b induits par les complexes immuns, M2c induits par les glucocorticoïdes, ainsi que les M2d dont les propriétés sont similaires à celles des macrophages associés aux tumeurs (TAM), induits à leur tour par des agonistes de TLR (Figure 1.3) (Shapouri-Moghaddam et al., 2018b).

L'activation polarisée des macrophages peut être traduite par la présence d'une signature génétique, qui se présente sous forme de transcriptome spécifique à l'environnement tissulaire, ou celui de culture cellulaire où ils se trouvent, afin de produire les deux types cellulaires; M1 et M2 nécessaires à la destruction des agents pathogènes et la réparation tissulaire, respectivement (Tableau 1.2) (Orecchioni et al., 2019).

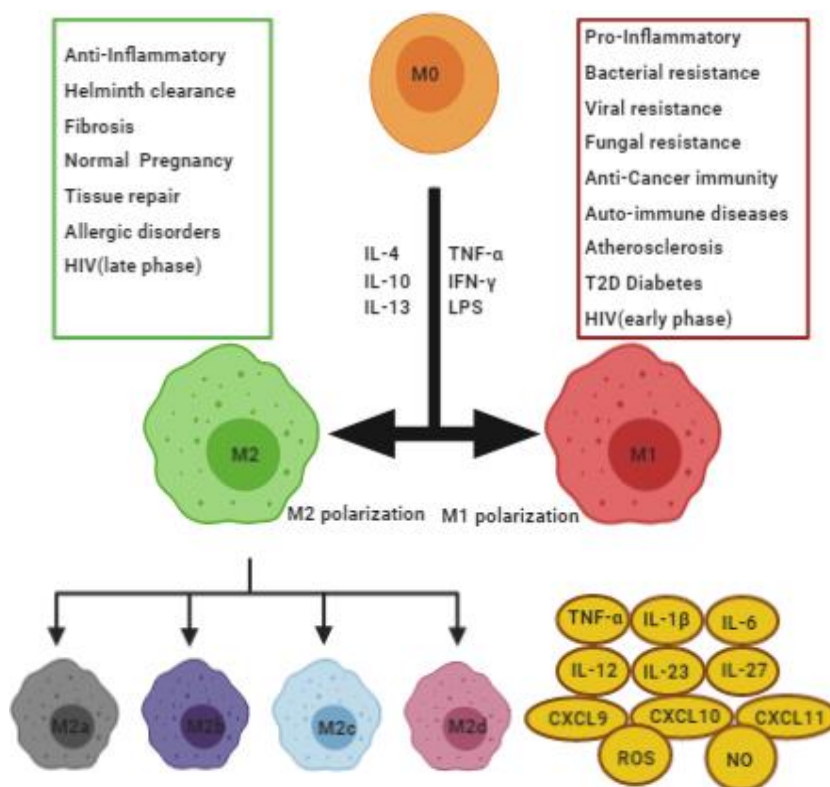


Figure 1.3. Impact de la polarisation des macrophages sur le profil de libération de cytokines. Le processus de polarisation des macrophages vers un profil pro- ou antiinflammatoire est orienté principalement par les cytokines du milieu local, où se situent les macrophages caractérisés par l'expression des marqueurs de surface, la production de facteurs spécifiques, ainsi que leurs fonctions biologiques.

Tableau 1.2. Transcriptomes spécifiques aux macrophages M1 et M2 *In vivo* et *In vitro*

<i>In vivo</i>		<i>In vitro</i>	
Expression génétique			
M1	M2	M1	M2
Molécules d'adhésion ICAM-1	Protéine de liaison Gab1 activatrice de la voie Akt	Gènes codant le CXCL1 et le CXCL2	Gène codant le CD206 favorisant l'expression de cytokine et chimiokines antiinflammatoires
Gènes codant le GM-CSF favorisant le profil proinflammatoire			
Gène codant l'IRF-1 pour la régulation positive de l'expression et la production de l'iNOS	Gènes responsables de la modification et la réparation lipidique	Gène codant le TRAF-1 nécessaire à l'induction des cytokines proinflammatoires	Gène codant le CD9 nécessaire à la modulation de l'adhésion et la migration cellulaire

1.3 M1 et profil proinflammatoire

Les macrophages identifiés comme de grandes cellules mononucléées phagocytaires et présentatrices antigéniques, sont caractérisés par une plasticité phénotypique ciblée par les maladies inflammatoires.

Leur polarisation est regroupée en deux grands programmes canoniques : M1 et M2, chacun lié à une réponse spécifique afin de maintenir l'homéostasie.

L'inflammation est une réponse physiologique à divers agents, notamment ceux responsables des infections, elle aboutit à une réponse immunitaire qui aille de la reconnaissance des agents pathogènes et le recrutement cellulaire, jusqu'à la réparation et la cicatrisation tissulaire. Sa phase aiguë a un profil proinflammatoire assuré principalement par des macrophages classiquement activés (Figure 1.4) (Atri et al., 2018).

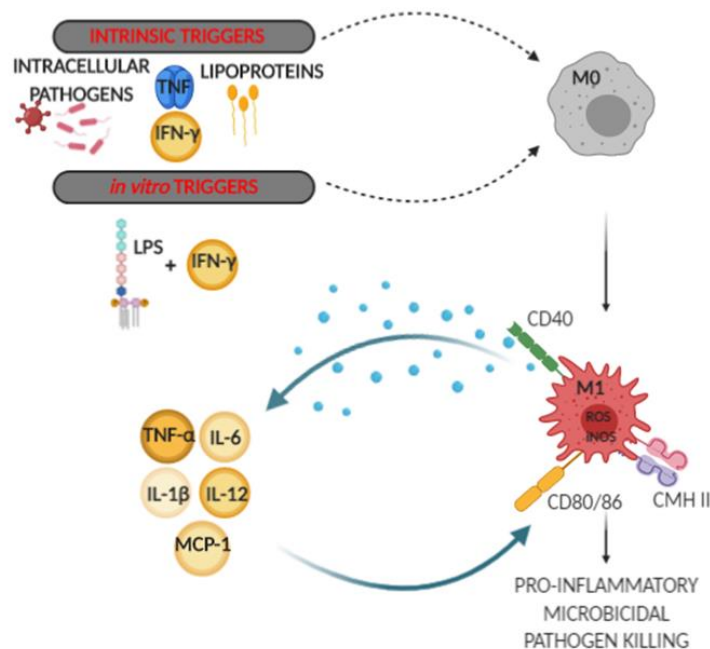


Figure 1.4. Macrophage classiquement activé et profil proinflammatoire. Certains agents infectieux sont à l'origine d'une réponse inflammatoire, suite à la polarisation des macrophages vers un phénotype classiquement activé, responsable de la destruction du pathogène reconnu.

1.3.1 M1 en infection et en inflammation

A. macrophages M1 en infection

- Infections bactériennes

Après avoir reconnu certain stimulus microbien, notamment le LPS, IFN-γ et TNFα, les macrophages se convertissent vers un profil M1, afin de pouvoir exercer leurs

fonctions cytotoxiques contre les bactéries dotées d'une infection intracellulaire, en produisant des niveaux élevés des ROS.

Tout comme le cas de la tuberculose, la mort cellulaire des LT influence l'activation des macrophages M1, ces derniers favorisent la formation de granulomes et augmentent leur activité bactéricide.

- **Infections virales**

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) permet la polarisation des macrophages vers un phénotype M1 dont la réponse antivirale est très efficace en réduisant les lésions tissulaires en phase précoce.

Cette même infection peut conduire à la réplication virale en cas d'altération de la sécrétion de cytokines proinflammatoires et la réduction de l'activité phagocytaire.

- **Infections parasitaires**

Elles sont contrôlées principalement par des macrophages M2. Cependant, un équilibre des deux phénotypes est essentiel pour le contrôle des résultats de la maladie, par le fait de régler les molécules immunorégulatrices favorisant l'infection chronique liée au profil M2 telles que l'IL-10.

- **Infections fongiques**

Afin de pouvoir coloniser l'hôte, les pathogènes fongiques utilisent la technique de polarisation ou repolarisation des macrophages, qui diffèrent d'une souche à une autre et dont le profil M1 est nécessaire à l'éradication du pathogène, à la résolution de l'infection, ainsi qu'à la production des ROS pour une bonne activité antifongique (Shapouri-Moghaddam et al., 2018c).

B. Macrophage M1 en inflammation

Les macrophage M1 sont responsables du déclenchement d'une réponse inflammatoire et antifibrotique en cas de fibrose, où ils assurent la régulation du renouvellement du dépôts de composants protéiques, en libérant des ROS et des enzymes dégradant ces dépôts, ainsi que des cytokines (IL-1 β , IL-12 et TNF- α), et des chimiokines comme le MCP-1, IL-8, CCR-2 et le iNOS (Shapouri-Moghaddam et al., 2018c).

1.3.2 Macrophages classiquement activés et pathologies

A. Macrophage M1 et maladies inflammatoires

- Asthme et troubles allergiques

L'inflammation des voies respiratoires, l'obstruction et l'hyperactivité sont des caractéristiques définissant la pathogénèse de l'Asthme, associée à l'activation alternative des macrophages en réponse à des allergènes bronchiques, mais aussi la

polarisation M1 responsable de la production et la libération des cytokines inflammatoires, et du NO favorisant l'exacerbation des lésions pulmonaires.

- **Diabète de type 2 (DT2)**

La pathogénèse du diabète de type 2 (DT2) comprend environ 95 % des patients diabétiques, son processus pathologique est régulé par des macrophages tissulaires, dont la présence d'une forte concentration du glucose favorise leur expression de marqueurs proinflammatoires, puis leur production de cytokines et chimiokines spécifiques, contribuant à une inflammation locale et systémique, qui entraîne par la suite un dysfonctionnement des cellules β pancréatiques et une insulino-résistance.

- **Athérosclérose**

Une maladie inflammatoire progressive affectant les artères, suite à la formation des plaques athérosclérotiques, constituées principalement de noyaux nécrotiques, lipides, cellules musculaires lisses enflammées et cellules de mousse.

Pendant son processus inflammatoire, et en réponse à des signaux spécifiques, les monocytes sanguins migrent vers les tissus enflammés afin de produire des cytokines proinflammatoires, et se différencier en cellules de mousse formant des plaques et influençant par la suite la progression de la maladie.

- **Maladies auto-immunes**

Les macrophages classiquement activés jouent un rôle essentiel dans la pathogénèse de nombreuses maladies auto-immunes, notamment la polyarthrite rhumatoïde (PR), en sécrétant des cytokines proinflammatoires dont l'IL-1 β causant des lésions inflammatoires.

En cas de sclérose en plaques (SEP) ; les macrophages M1 favorisent la perte axonale, mais aussi la production du GM-CSF par les LTh nécessaires au développement, et à la gravité de la maladie (Shapouri-Moghaddam et al., 2018c).

La pathogénèse du diabète auto-immun de type 1 (T1D) résulte de la destruction, à médiation par les cellules T, des cellules β productrices d'insuline, où le système immunitaire inné façonne de façon critique l'immunité adaptative diabétogène, grâce aux macrophages dérivés de monocytes infiltrant les tissus, qui jouent un rôle proinflammatoire dans la maladie (Thornley et al., 2016). Ce sont des cellules dont le rôle est vital dans les phases d'initiation et d'effecteur du T1D, en produisant des radicaux libres et des cytokines proinflammatoires, pour faciliter la destruction des cellules β et pour présenter l'antigène aux cellules T autoréactives (Burg and Tse, 2018).

- **COVID 19**

L'infection par (SRAS)-CoV-2 est à l'origine d'une hyperinflammation pulmonaire agressive et non contrôlée. Elle est caractérisée par une tempête de cytokines et

chimiokines proinflammatoires, responsable de lésions pulmonaires pouvant mener au décès. Cette inflammation conduit à une pyroptose massive des cellules infectées, mais aussi à la régulation négative de l'expression de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2) ; le ligand de la protéine de pointe de l'enveloppe virale (*spike*, S), favorisant l'augmentation de lésions pulmonaires en augmentant leur perméabilité vasculaire. Cela conduit vers un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA), associé lui-même à une forte production de facteurs inflammatoires, notamment l'IL-6, le TNF- α , et la molécule CXCL-10 (Fu et *al.*, 2020).

B. Macrophages M1 et lésions tissulaires

Une signalisation *via* le récepteur TREM2 à la surface des macrophages permet leur différenciation en phénotype proinflammatoire M1, ces derniers dérivés des monocytes sanguins peuvent retarder considérablement le processus de réparation axonale, suite à une lésion traumatique de la moelle épinière par l'accumulation du Fer, ou la production de l'IL-1 β , mais aussi le TNF- α qui à son tour bloque la conversion des macrophages M1 vers un profil réparateur M2, en prolongeant leur activation responsable de la perturbation de l'homéostasie tissulaire (Wynn and Vannella, 2016b).

C. Macrophages M1 et cancer

- Cancer de la prostate

L'efférocytose, processus par lequel les cellules apoptotiques sont éliminées par les cellules phagocytaires, des macrophages dérivés de la moelle osseuse des cellules cancéreuses apoptotiques dans un microenvironnement tumoral, induit leur polarisation vers un profil M2 caractérisé par la sécrétion de cytokines proinflammatoires, notamment l'IL-6, IL-23 et le TNF- α , ainsi que les facteurs immunosuppresseurs, y compris le TGF- β et l'IL-10, favorisant par la suite l'inflammation tissulaire, mais aussi l'accélération de la croissance, la progression et les métastases tumorales.

Les macrophages efférocytaires traités par l'IFN- γ ou le LPS, sont polarisés vers un profil M1 qui permet de réduire l'inflammation et la croissance tumorale, en sécrétant des cytokines antiinflammatoires (Mendoza-Reinoso et *al.*, 2020).

1.4 Famille STAT

Le développement du SI, la croissance, la survie et la différenciation cellulaire peuvent être régulés par l'activité biologique des transducteurs de signal et les activateurs de protéines de transcription (STATs), suite à la fixation de certaines cytokines spécifiques sur leur récepteurs appropriés ; la voie de signalisation mise en valeur dans ce cas est

dite JAK-STAT, elle est ciblée thérapeutiquement en raison de l'apparition de nombreuses pathologies, notamment les immunodéficiences et la sensibilité aux infections, lorsque les gènes codant les STATs sont mutés (Mitchell and John, 2005).

La voie de signalisation débute dans le milieu extracellulaire, où les cytokines s'associent à leurs récepteurs transmembranaires spécifiques provoquant ainsi leur hétérodimérisation, qui entraîne à son tour l'activation des janus kinases (JAK), responsables de la phosphorylation des queues cytoplasmiques des récepteurs, où se fixent les STATs afin d'être phosphorylés, dimérisés *via* leurs domaine SH2, puis transloqués vers le noyau (Figure 1.5), pour se lier à des sites gamma-activés (GAS), dans les promoteurs de gènes cibles contribuant à leur transcription génétique.

Cette activité est modulée par des histones acétylases et désacétylases, elle est aussi régulée négativement par les SOCS et les SHP (Figure 1.6).

La famille STAT comporte 7 types de facteurs de transcription (TF) classiques, spécifiques et redondants, ayant des fonctions différentes au niveau cellulaire et de l'organisme, en régulant l'expression de gènes spécifiques ; ils sont caractérisés par leur colocalisation où différents STATs possèdent des effets analogues sur la transcription génique (Villarino et al., 2017).

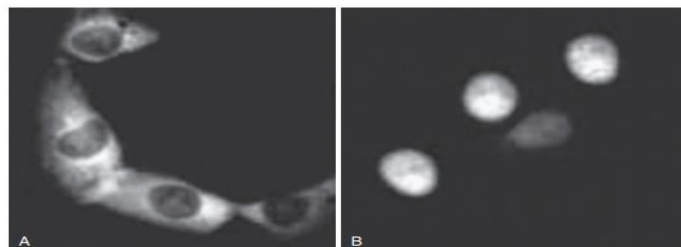


Figure 1.5. Démonstration de la localisation des protéines STATs en réponse à la cytokine de signalisation. L'observation de la migration des STATs du cytoplasme vers le noyau au niveau des cellules U3B exprimant ce facteur de transcription en cas d'absence (A) ou de présence (B) de traitement avec la cytokine d'intérêt.

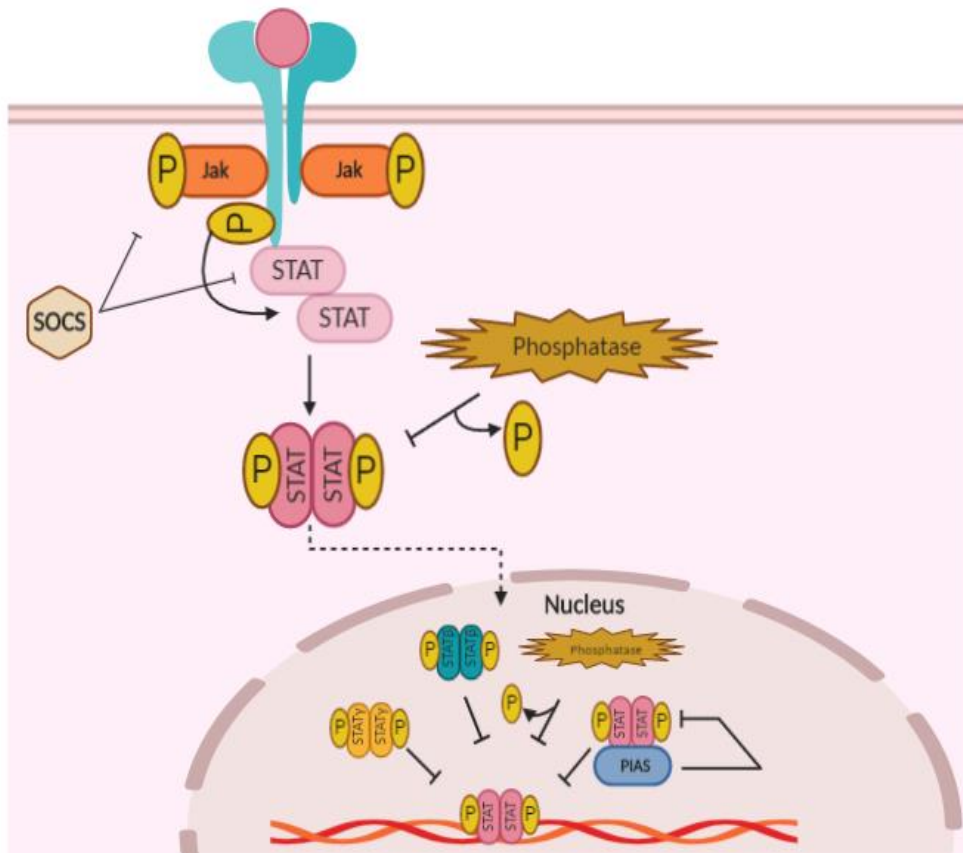


Figure 1.6. La voie de signalisation JAK/STAT. La voie de signalisation débute dans le milieu extracellulaire, où les cytokines s'associent à leurs récepteurs transmembranaires spécifiques provoquant ainsi leur hétérodimérisation, qui entraîne l'activation des JAK responsables de la phosphorylation des queues cytoplasmiques des récepteurs, où se fixent les STATs afin d'être phosphorylés, dimérisés *via* leurs domaine SH2, puis transloqués vers le noyau, dans les promoteurs de gènes cibles pour leur transcription génétique sous la régulation négative par les SOCS et les SHP

1.4.1 Structure protéique

Les sept types de protéines STATs sont organisés en domaines fonctionnels distincts, mais partagent une topologie moléculaire de 7 domaines protéiques (Figure 1.7) (Villarino et *al.*, 2017).

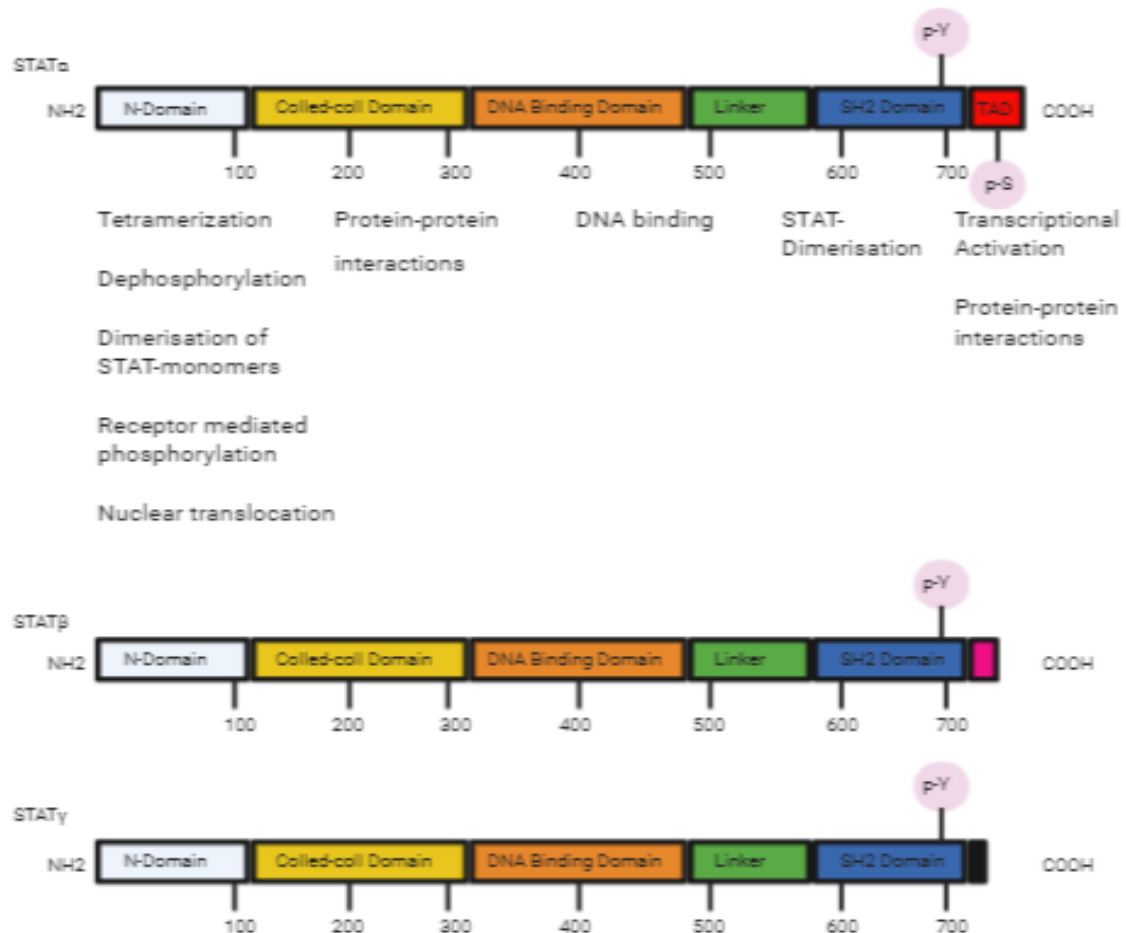


Figure 1.7. Structure protéique des STATs. STAT α

-Le domaine Nt est nécessaire pour les interactions protéine-protéine entre les monomères STAT non phosphorylé afin de former des dimères ou des tétramères lorsque la liaison se fait entre deux dimères.

-Le domaine des bobines enroulées est composé de signaux de localisation et est nécessaire pour les interactions protéine-protéine

-Le domaine de liaison à l'ADN est constitué de signaux nucléaires d'import-export, il se lie directement à l'ADN

-Le domaine de l'éditeur de lien favorise l'activité transcriptionnelle

-Le domaine SH2 permet la dimérisation et l'interaction avec le récepteur en amont

-Le domaine de transactivation est nécessaire à la signalisation canonique, il contient des résidus de Tyrosine phosphorylé

-Le domaine Ct assure la fonction canonique et non canonique, il comporte des résidus de Sérine phosphorylé

STAT β et STAT γ sont deux structures protéique tronquées grâce à l'épissage alternatif ou au traitement protéolytique

La protéine STAT4 est présente sous deux formes différentes, l'une est appelée STAT4a, tandis que l'autre est tronquée et est appelée STAT4b (Watford et *al.*, 2004).

1.4.2 STAT4

Est le quatrième membre de la famille STAT situé au niveau du cytoplasme avec des effets à la fois pro- et antiinflammatoires. Il a été d'abord cloné par PCR et il est l'un des principaux STATs activé par l'IL-12, d'autres cytokines peuvent également le phosphorylé afin d'induire sa fonction, mais dans une moindre mesure, y compris l'IL-21, 27, 2 et l'IFN I.

Cependant, son expression peut être régulée négativement par la protéine inhibitrice PIAS γ ou PIAS4 (Shaheen and Broxmeyer, 2018). Il peut être exprimé au niveau des cellules myéloïdes, en particulier dans les monocytes du sang périphérique activés (Ysmail-Dahlouk et *al.*, 2016a), macrophages et cellules dendritiques (DC), le thymus et les testicules.

1.4.3 Gène STAT4

Le gène codant STAT4 se situe au niveau du chromosome 2q33 (Figure 1.8), sa distribution est limitée aux cellules myéloïdes, au thymus et aux testicules, où son activation par l'IL-12 principalement, conduit à la transcription des gènes de l'IFN- γ , l'IL-18R1, mais aussi le MyD88 (Tsao and Deng, 2011). Son cadre de lecture est composé de 27 exons (Wu et *al.*, 2018).

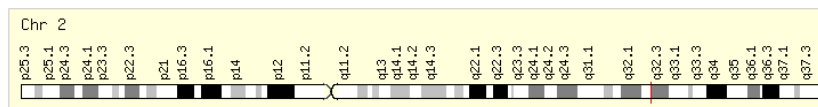


Figure 1.8. Structure du gène codant le STAT4.

1.4.4 Voie de signalisation STAT4

La fixation de l'IL-12 sur son récepteur active TYK2 par l'IL-12R β 1 et JAK2 par l'IL-12R β 2, suite à la dimérisation du récepteur ; une autophosphorylation et une transphosphorylation initient la transduction du signal, ensuite les domaines intracellulaires des sous-unités réceptrices servent de sites d'accueil, après phosphorylation de leur Tyrosine pour les STAT4, ces derniers se phosphorylent au niveau de leur Tyrosine 693 et la Sérine 721, puis s'homodimérisent par l'association intermoléculaire de leur domaine SH2, et migrent vers le noyau afin d'assurer la transcription de gènes cibles en se liant à leurs promoteurs, notamment le gène de l'IFN- γ et l'IL-17, respectivement (Figure 1.9) (Ueno, 2020).

La protéine STAT4 peut également être activée par l'IFN- γ , l'IL-23 et l'IL-17 au niveau des lignées cellulaires chez les patients atteints de leucémie monocyttaire.

Les gènes cibles des STAT4 peuvent être regroupés en sous-ensembles par fonction, y compris le cluster lié au phénotype Th1, la signalisation TCR, les cytokines et les récepteurs (Watford et al., 2004).

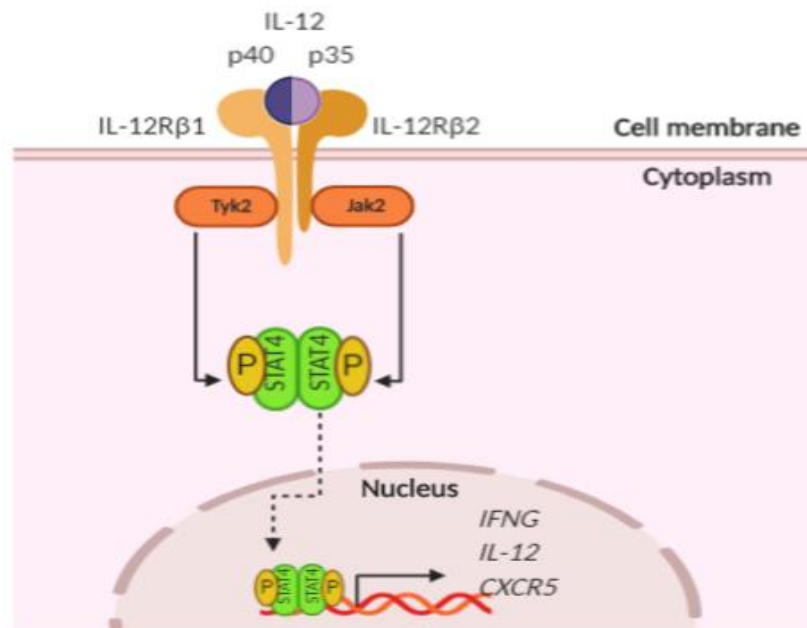


Figure 1.9. Voie de signalisation IL-12 / STAT4. La fixation de l'IL-12 sur son récepteur active TYK2 par l'IL-12Rβ1 et JAK2 par l'IL-12Rβ2, suite à la dimérisation du récepteur ; une autophosphorylation et une transphosphorylation initient la transduction du signal, les STAT4 se fixent ensuite sur leur sites d'accueil, afin d'être phosphorylé par les JAK, puis s'homodimérisent par l'association intermoléculaire de leur domaine SH2, et migrent vers le noyau afin d'assurer la transcription de gènes cibles en se liant à leurs promoteurs, notamment le gène de l'IFN- γ et l'IL-12 et le CXCR5.

1.4.5 Rôles des STAT4

Une résistance innée de l'hôte est augmentée par la production de cytokines proinflammatoires lors d'une infection, l'IL-12 et l'IL-23 en fait partie, elles partagent la même sous unité, IL-12Rβ1, et activent la voie de signalisation TYK2/JAK2/STAT4, afin de favoriser une réponse inflammatoire ainsi que d'autres fonctions :

A. Rôles positifs des STAT4

- STAT4 régule la différenciation Th1

La lèpre est une maladie infectieuse due à une bactérie intracellulaire très fréquente en Inde, les patients malades peuvent être lépromateux avec une

prédominance d'une réponse immunitaire à médiation humorale, ou à médiation cellulaire en cas de ceux tuberculeux, présentant une forme clinique associée à la polarisation des LTCD4+ vers un profil proinflammatoire, dans lequel les STAT4 sont activés par l'IL-12 au niveau des LT ayant déjà reconnu l'antigène (Ag), cela conduit à la différenciation des cellules lymphoïdes en Th1 producteurs d'IFN- γ : une cytokine protectrice qui empêche l'infection chez les sujets sains et la limite chez les patients lépreux (Upadhyay et *al.*, 2019).

- **STAT4 favorise l'activité des LTh17**

Il a été décrit que les effecteurs engagés LTCD4+, possèdent une capacité de fonctionnement indépendante de l'activation du TCR par l'Ag, mais plutôt par le fait de recevoir des signaux synergiques d'un activateur STAT.

En présence d'IL-23, leur différenciation en Th17 est accompagnée d'une régulation positive des gènes codant l'IL-1 β R, IL-18 et IL-12R, ce dernier fixe l'IL-12 qui agit en synergie avec l'IL-1 β ou l'IL-18, afin de stimuler la production d'IFN- γ , pour pouvoir assurer leur fonctions dans les processus inflammatoires, les maladies auto-immunes, le cancer et les allergies (Lee et *al.*, 2017).

- **STAT4 et activité antivirale et anti-apoptotique**

L'axe IFN- α/β - STAT4 au niveau du macrophage conduit à la production d'IFN- γ , doté d'une activité de régulation antivirale et antiproliférative, la même cytokine est également responsable de l'inhibition de l'apoptose médiée par Fas/FasL en réponse à l'IL-12 (Wang et *al.*, 2015).

L'axe IL-12 / STAT4 induit la prolifération et l'activité cytotoxique des cellules Natural Killer (NK), la maturation des cellules cutanées de Langerhans, ainsi que l'expression des gènes de cytokines, chimiokines et leurs récepteurs (Watford et *al.*, 2004)

B. Rôles négatifs des STAT4

- **STAT4 dans le lupus érythémateux disséminé**

le lupus érythémateux disséminé (LED), est une maladie auto-immune causée par divers types cellulaires au niveau du sang et des tissus enflammés, notamment les LB autoréactifs doubles négatifs CD27⁻ IgD⁻ CD11c⁺, leur fonctions de sécrétion d'autoanticorps est médiée principalement par les LTfh1 productrices d'IFN- γ et d'IL-21, grâce à l'axe IL-12/STAT4 (Ueno, 2020).

- **STAT4 et maladies du foie**

La production accrue de l'IFN- γ par les cellules NK, NKT et LT *via* une signalisation STAT4 médiée par l'IL-12 sécrété par les macrophages, LB ou DC

joue un rôle important dans l'inflammation, les lésions hépatiques et la fibrogénèse.

La même voie de signalisation est responsable du développement d'une cirrhose biliaire primitive.

Une chimiothérapie peut induire une carence en STAT4, qui contribue à son tour à la production d'une faible concentration d'IFN- γ favorisant le développement d'un lymphome (Wang et al., 2015).

1.4.6 Protéine STAT4 et macrophage M1

L'expression de STAT4 au niveau des macrophages classiquement activés est essentiel dans développement de divers processus biologiques ;

- STAT4 : un initiateur de l'inflammation dans le tissu adipeux

Il existe une diapasonie entre les adipocytes et les macrophages résidents concernant la régulation métabolique des différents tissus, en revanche, cet équilibre peut être biaisé au niveau du tissu adipeux blanc (WAT), en réponse à l'apport alimentaire, dans ce cas, les cellules immunitaires de type Th1/Th2 ou M1/M2 peuvent être impliqués, grâce à leur expression du facteur de transcription STAT4.

L'activation du STAT4 par l'IL-12 favorise la polarisation directe des LTCD4+ vers un profil Th1, et les monocytes sanguins vers un phénotype M1 impliqués dans l'inflammation du WAT et l'insulinorésistance (Figure1.10) (Knudsen and Lee, 2013).

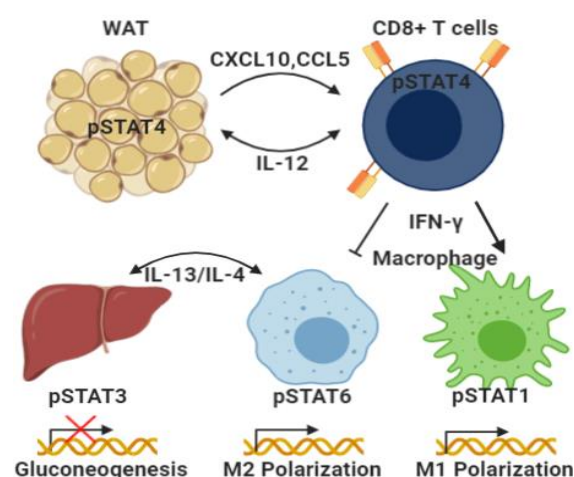


Figure 1.10. Initiation de l'inflammation dans les tissus adipeux. Le paradigme Th1 / Th2 ou M1 / M2 décrit comment la signalisation immunitaire module l'homéostasie métabolique, notamment au sein des tissus adipeux. STAT1 phosphorylé (pSTAT1) régule la polarisation M1 des macrophages en réponse aux cytokines Th1, tandis que pSTAT6 favorise la polarisation M2. De plus, les cytokines Th2 activent pSTAT3 dans

le foie pour supprimer l'expression des gènes gluconéogéniques. Les chercheurs suggèrent que la fonction combinée de pSTAT4 dans les adipocytes et les cellules T entraîne une infiltration accrue des cellules CD8 + dans WAT, où l'IFN- γ dérivé des cellules CD8 + médie le recrutement et l'activation des macrophages M1, contribuant ainsi à un dysfonctionnement métabolique

- **STAT 4 et tuberculose**

La tuberculose est une maladie infectieuse causée par la bactérie *Mycobacterium tuberculosis*, contagieuse, avec des signes cliniques variables. Elle arrive en tête des causes de mortalité d'origine infectieuse à l'échelle mondiale, devant le sida.

La défense immunitaire innée de l'hôte contre l'infection bactérienne implique principalement des macrophages proinflammatoires, où se synergisent l'IL-12 et l'IL-18 en cas de leur infection par la bactérie, afin d'induire une cosignalisation de p38-MAPK et STAT4, activant ainsi l'autophagie, la production d'IFN- γ nécessaire à la régulation positive de l'expression des peptides antimicrobiens, et l'inhibition de la croissance mycobactérienne intracellulaire (Yang et al., 2018).

- **STAT4 et activité microbicide**

La programmation des activités fonctionnelles des macrophages, y compris celle de microbicide, est médiée par l'effet autocrine de l'IL-12 et l'IL-23 produites par la même cellule en réponse à des agents pathogènes, notamment le LPS. Ces deux cytokines induisent une cascade de signalisation JAK2/TYK2-STAT4, qui conduit à la production du NO, IL-1 et TNF- α nécessaire à l'adoption d'un phénotype proinflammatoire, mais aussi la modification de l'équilibre Th1/Th2.

Le signal STAT4 au niveau des macrophages M1 permet donc de réduire la capacité parasitaire dans les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), et d'augmenter leur capacité phagocytaire et celle de présentation antigénique (Bastos et al., 2004).

- **STAT4 et lésions pulmonaires**

L'expression du gène STAT4 au niveau des macrophages suite à l'action de l'IFN- α , induit par le LPS à la surface des bactéries Gram⁻, conduit à la différenciation de ces cellules accessoires vers un phénotype M1, libérant des taux élevés de cytokines proinflammatoires après s'être infiltré dans les poumons, afin de provoquer des lésions pulmonaires.

Une étude a donc suggérée qu'une perturbation des STAT4 est nécessaire pour l'inhibition de l'inflammation et la protection contre les blessures (Fu et al., 2016).

1.4.7 Variants SNPs du gène STAT4 associés au profil proinflammatoire

Le corps humain est constitué de milliards de cellules qui comportent chacune un noyau, lequel abrite l'information génétique. Celle-ci est répartie sur 23 paires de

chromosomes constitués principalement d'ADN (acide désoxyribonucléique), qui porte les gènes.

Quand un gène dévie de la normalité, on dit qu'il est muté ou encore qu'il est porteur d'un variant. Cependant, une mutation ou un variant non délétères ne sont pas synonymes de maladie, mais plutôt du polymorphisme, contrairement à celles/ceux délétères qui sont responsables d'un effet pathogène. Le gène *STAT4* en fait partie, ce dernier présente différents variants SNPs avec des caractéristiques distinctes (Tableau 1.3).

Tableau 1.3. Caractéristiques des SNPs STAT4.

SNPs	Chromosome	Emplacement (pb)	Emplacement dans le gène
rs7574865	2	191, 964, 633	Intron 3
rs4853542	2	191, 976, 602	Intron 3
rs1031509	2	192, 010, 189	Intron 3
rs897200	2	192, 017, 771	5'-flanquant
rs7582694	2	-	Intron 3

- Polymorphisme du gène *STAT4* :

Dans la SEP et le LED

La SEP et le LED sont deux maladies auto-immunes chroniques à forte composante génétique et environnementale. Elles sont associées au polymorphisme rs7582694 du gène *STAT4*.

La fréquence du génotype *STAT4* CC et celle *STAT4* GC du SNPrs7582694 ont été significativement plus détectées chez les patients atteints de SE et de LED, que chez les témoins avec ($p=0.01$ et 0.05 , $p=0.001$ et 0.01), respectivement (Nageeb et al., 2018).

En hépatite B

Le facteur de transcription *STAT4* est considéré comme une protéine clé dans l'inflammation du foie, il a été prouvé que l'allèle G de *STAT4* rs7574865 est un facteur de risque d'infection chronique par le virus de l'hépatite B (VHB), et du carcinome hépatocellulaire chronique (CHC), avec ($p<0.01$ et $p<0.05$), respectivement (Shi et al., 2019).

Dans le syndrome de Sjögren

De nombreux polymorphismes des gènes non HLA peuvent être associés aux phénotypes de diverses pathologies, y compris à ceux de la maladie auto-immune des glandes exocrines dite syndrome de Sjögren (SS), caractérisée par

un fond génétique prédisposant dont les polymorphismes du gène *STAT4* en fait partie.

Le maintien du processus inflammatoire local de la maladie est aussi assuré par l'IL-17, produit par les cellules Th17 après avoir répondu au signal *STAT4*.

Cela explique encore mieux l'association entre l'allèle mineur du rs7574965 situé sur le troisième intron du gène *STAT4*, et le risque élevé de développer le composant monoclonal et la leucopénie ($p=0.002, OR=7.6$; $p=0.048, OR=2.01$), respectivement (Colafrancesco et *al.*, 2019).

1.5 Polymerase chain reaction

L'hybridation moléculaire, le séquençage ainsi que la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), sont des techniques indispensables dans la biologie moléculaire, cette dernière fait référence à l'étude des acides nucléiques : ribonucléique (ARN), et désoxyribonucléique (ADN).

La PCR est une technique enzymatique *in vitro* hautement sensible, simple et élégante, découverte par Dr.Karry Mullis, elle permet d'amplifier exponentiellement des fragments d'ADN spécifiques génomiques ou complémentaires (ADNc), à partir d'un pool complexe d'ADN issu du sang périphérique, peau, cheveux, salive et microbes afin de le séquencer, cloner ou analyser.

1.5.1 Principe

La PCR est une technique réalisée automatiquement au niveau d'un thermocycleur, capable de générer des millions de copies de la séquence cible à partir d'une très faible concentration initiale d'ADN, en utilisant des amorces nucléotidiques, dont l'élaboration nécessite de connaître les séquences flanquantes de la molécule à amplifier, à lesquelles sont complémentaires.

La région d'ADN cible est donc copiée par incorporation de nucléotides libres, grâce à l'enzyme ADN polymérase thermostable.

1.5.2 Applications

- Une PCR quantitative classique permet le diagnostic précoce des infections bactériennes, virales ou fongiques, telles que la détection de *M.tuberculosis* dans les prélèvements respiratoires.
- Une PCR universelle du gène codant l'ARN ribosomal 16S est utilisée dans le diagnostic des endocardites infectieuses à hémoculture négatives.
- Une PCR multiplexe permet la détection de plusieurs séquences d'ADN différentes en une seule réaction, elle est basée sur l'utilisation de plusieurs amorces distinctes, dont la conception doit être optimisée afin qu'elles puissent fonctionner à la même température.

- Identification de criminels en médecine légale.

1.5.3 Acteurs de la PCR

- ADN matrice : sous forme d'ADN double brin (ADNdb).
- Amorces : Sens et Anti-sens, sont de courts fragments d'ADN complémentaires aux extrémités de l'ADN matrice d'une longueur de 20 à 30 nucléotides, et un nombre approximativement égal des 4 bases azotés, avec une distribution équilibrée des résidus G et C. Elles sont considérées comme de points d'extension pour l'ADNdb.
- Nucléotides libres : comprennent les 4 bases azotés présentes dans l'ADN: dGTP, dATP, dTTP, et dCTP, appelés globalement dNTPs (DésoxyNucléotides-Tri-Phosphates).Elles sont considérées comme des blocs de construction.
- ADN polymérase : il s'agit bien de la Taq ADN polymérase, une enzyme issue d'une bactérie *Hemophilus aquaticus* vivant dans les sources d'eau chaudes. Est l'enzyme clé reliant les nucléotides libres aux amorces afin d'obtenir le produit de la PCR.

Sa température optimale d'action est de 72°C, et elle est capable de résister à des passages successifs à 95°C, ce qui a rendu possible l'automatisation de la procédure.

1.5.4 Etapes de la PCR

Après avoir mélangé les composés de la PCR dans une plaque à 96 puits, ou dans un tube à essai, et les insérer dans des trous d'un thermocycleur, ce dernier augmente et baisse la température par étapes discrètes, précises et préprogrammées.

- Etape 1 : Dénaturation, elle est basée sur le chauffage à 95°C pendant 30s, qui permet la séparation des deux brins d'ADN, l'homogénéisation du milieu réactionnel, ainsi que l'inhibition des autres enzymes potentiellement présentes dans la solution à l'exception de la Taq ADN polymérase qui reste stable à cette T°
- Etape 2 : Hybridation des amorces à 56-64°C pendant 30s avec leur brin complémentaire d'ADN dénaturé
- Etape 3 : Elongation à 72°C pendant 1min, cette étape est fondée sur le rôle de l'ADN polymérase qui synthétise le brin complémentaire de chaque brin d'ADN matrice, à partir des dNTPs du milieu réactionnel (Figure 1.11).

A la fin des cycles, les tubes seront incubés à 4°C pendant 1 nuit puis conservés à -20°C jusqu'à ce qu'ils soient retirés du thermocycleur.

Le nombre de copies de la séquence d'ADN à amplifier exponentiellement dépend du nombre de cycle à réaliser.

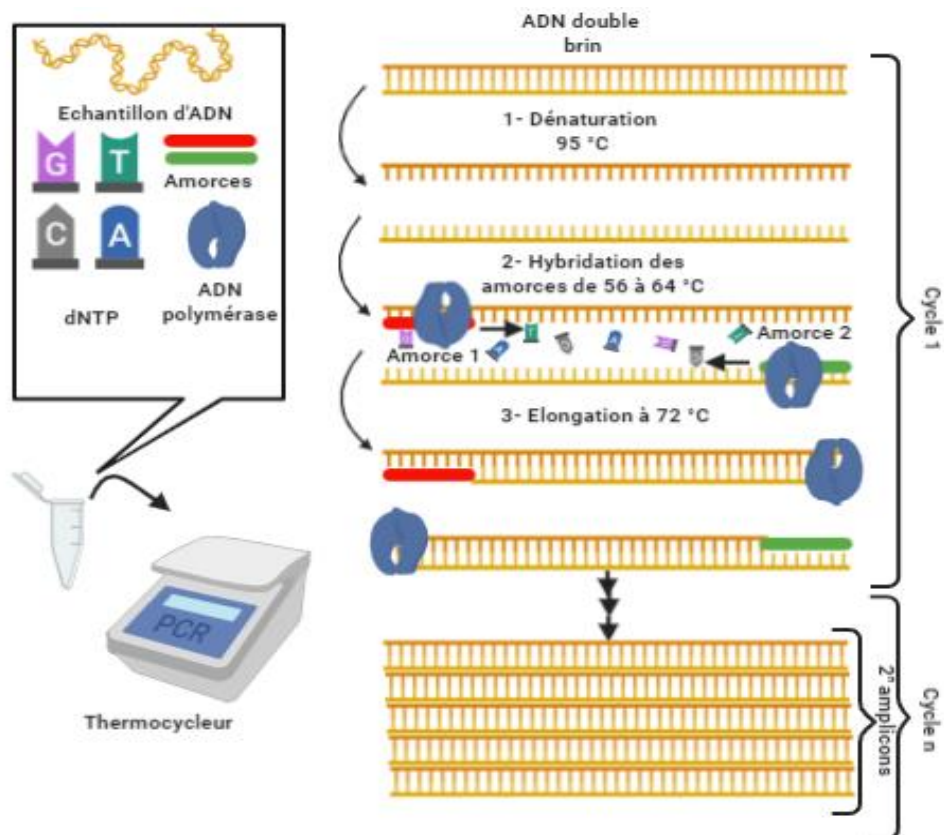


Figure 1.11. Les étapes de la technique d'amplification PCR. est une méthode de biologie moléculaire d'amplification génique *in vitro*, elle permet de dupliquer en grand nombre une séquence d'ADN ou d'ARN connue, à partir d'une faible quantité d'acide nucléique et d'amorces spécifiques constituées d'oligonucléotides de synthèse de 20 à 25 nucléotides

1.5.5 Analyse de produits PCR

Cela se fait par deux méthodes :

- Coloration du produit amplifié avec le bromure d'éthidium, un intercalant entre les deux brins.
- Etiquetage des amorces ou nucléotides de PCR avec des fluorophores avant l'amplification. Le marqueur sera donc directement incorporé dans le produit, suivi d'une électrophorèse sur gel d'agarose qui permet la visualisation, l'analyse et la détermination de produits d'ADN (Figure 1.12).

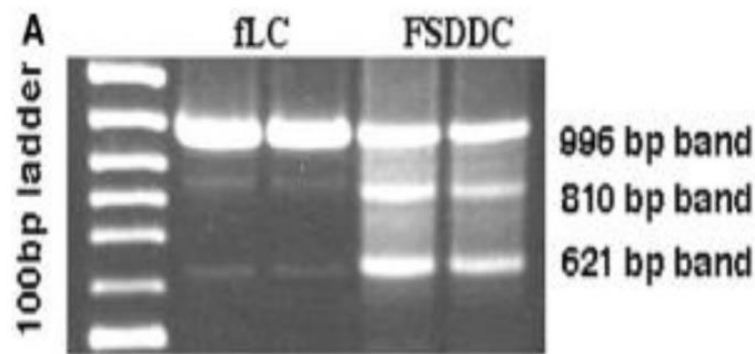


Figure 1.12. Visualisation des produits de PCR sur un gel d'agarose. Gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium montrant des produits de PCR de Langerin de souris pleine longueur obtenus à partir de LC frais C57BL / 6 (fLC) et de cellules dendritiques dérivées de la peau fœtale (FSDDC).

Bien que la PCR soit une technique fiable, elle a ses limites, les amorces utilisées peuvent s'hybrider non spécifiquement à des séquences similaires mais non identiques à l'ADN cible ; la cause pour laquelle le choix d'amorce est essentiel pour le bon déroulement de la technique.

1.5.6 choix d'amorces

- **la spécificité**

Il faut que les deux amorces soient complémentaires et spécifiques aux extrémités de l'ADN à amplifier, pour avoir des produits spécifiques et non pas aspécifiques.

- **La taille**

La séquence d'amorce doit être assez longue pour être suffisamment spécifique et ne pas se lier qu'à l'endroit voulu, mais assez courte pour que l'appariement se fasse rapidement et complètement. Sa taille optimale est de 20-30 nucléotides.

- **La température de fusion**

Notée T_m (melting temperature), doit être choisi entre 52°C et 58°C avec une différence entre les deux T_m qui ne dépasse pas 5°C. Une T_m trop haute augmente le risque de mauvais appariement, tandis qu'une T_m trop basse montre que l'appariement double-brin de l'amorce sera peu stable, et produira de moins bons résultats, elle est déterminée par la formule suivante :

$$T_m = 4(G + C) + 2(A + T) \text{ °C.}$$

- Pour que la réplication démarre il faut que l'extrémité 3' soit bien appariée jusqu'au bout, ce qui n'est pas vraiment nécessaire en 5'. La raison pour laquelle

le pourcentage en GC au niveau de l'extrémité 3' des deux amorces est d'au moins 40%.

- Il ne faut pas voir une complémentarité entre les deux amorces.
- Il ne faut pas avoir une complémentarité au niveau de la même amorce, sinon y aura la formation d'une épingle à cheveux (Garibyan and Avashia, 2013; Green and Sambrook, 2018; Uhel et *al.*, 2019)

Chapitre 2. Matériel et Méthodes

L'amplification d'ADN d'intérêt dans de nombreux domaines, notamment la recherche biomédicale, les tests de diagnostic et les tests médico-légaux repose sur l'utilisation de la PCR. Alors que son résultat peut être influencé par de nombreuses conditions, telles que la préparation de l'ADN matrice et les conditions de réaction, la conception d'une bonne paire d'amorces est considérée comme un facteur critique dont le choix des amorces appropriées est l'un des principaux facteurs affectant la PCR.

L'amplification spécifique de la cible visée nécessite que les amorces ne correspondent pas à d'autres cibles dans certaines orientations et à certaines distances qui permettent une amplification indésirable. Le processus de conception d'amorces spécifiques implique généralement plusieurs étapes (Ye et *al.*, 2012).

2.1 Critères d'une bonne paire d'amorces

Les amorces obtenues doivent répondre à sept principaux critères :

1- La matrice :

C'est le point de départ de toute amplification génétique à l'aide de l'hybridation des extrémités avec les amorces appropriées.

2- La taille de l'amorce:

Ce paramètre est essentiel pour le succès de la PCR.

En général, les oligonucléotides entre 20 pb et 25 pb sont extrêmement spécifiques de la séquence, à condition que la température d'hybridation soit optimale.

La longueur de l'amorce est également proportionnelle à l'efficacité de l'hybridation.

Ainsi, plus l'amorce est longue et moins l'hybridation est efficace.

3- La température de fusion :

La température de fusion (T_m) se situe entre 56 °C et 62 °C, avec une différence entre les deux températures de moins de 4 °C. Les températures d'hybridation des deux amorces doivent être les plus proches possibles, puisque la PCR est programmée en une seule température.

4- La spécificité :

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

5- La teneur en GC :

Doit être proche de 40%.

6- Longueur des produits à amplifier :

Les produits aspécifiques doivent avoir une longueur supérieure à 1000 pb, alors que celle du produit spécifique est inférieure à 1000 pb.

7- Absence de complémentarité entre les amorces :

Cela concerne les deux amorces, ainsi que la même amorce, afin d'éviter la formation d'épingle à cheveux.

2.2 Conception d'amorces

Deux méthodes sont proposées dans ce travail de Master : (i) Étapes de sélection des amorces sens et anti-sens par l'utilisation de PubMed., et (ii) Étapes de sélection des amorces sens et anti-sens par l'utilisation d'Ensembl.org, PubMed et Primer-Blast. (Figures 2.1 et 2.2 ci-après).

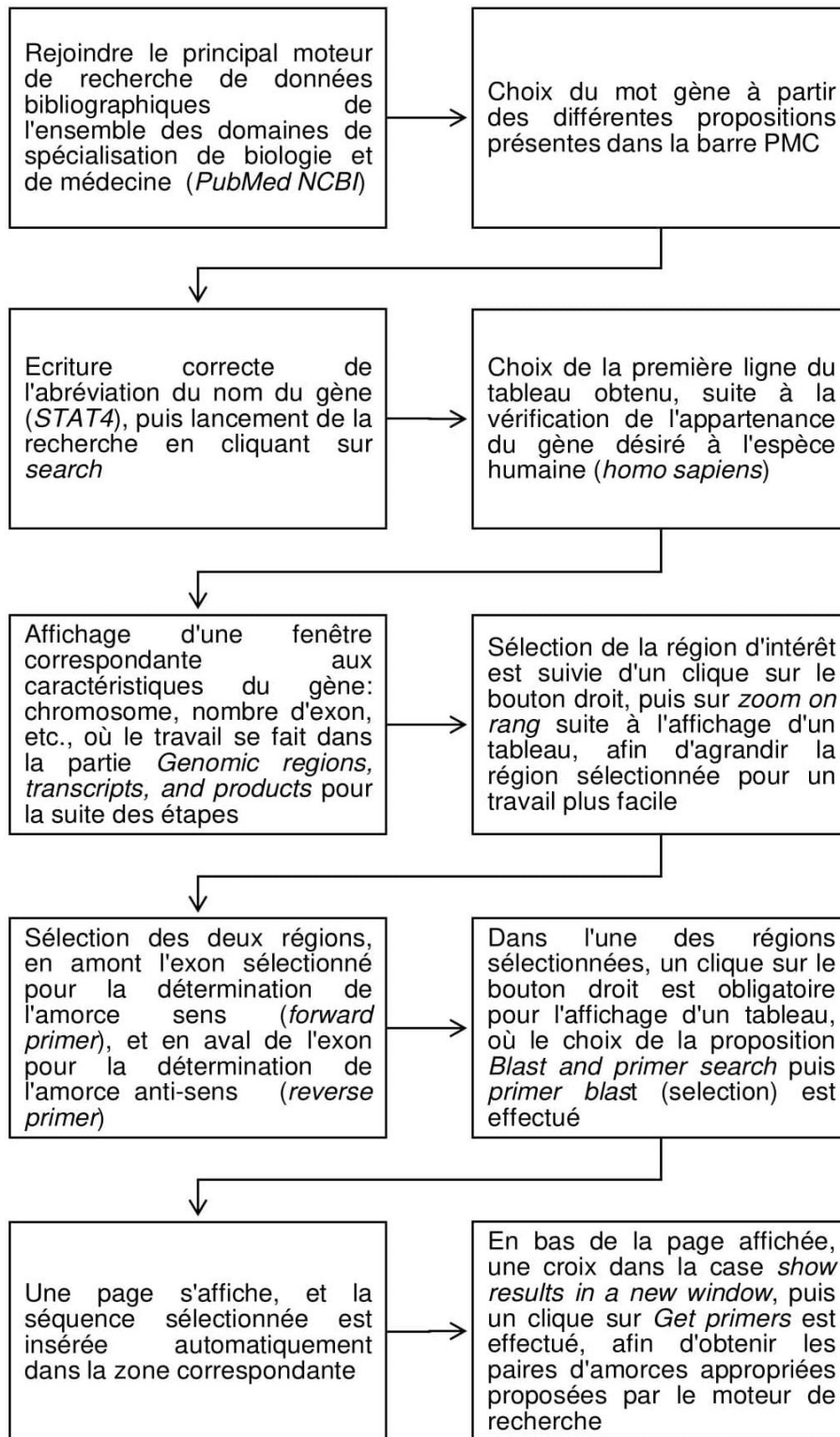


Figure 2.1. Etapes de sélection des amorces sens et anti-sens par l'utilisation de PubMed et Primer-Blast.

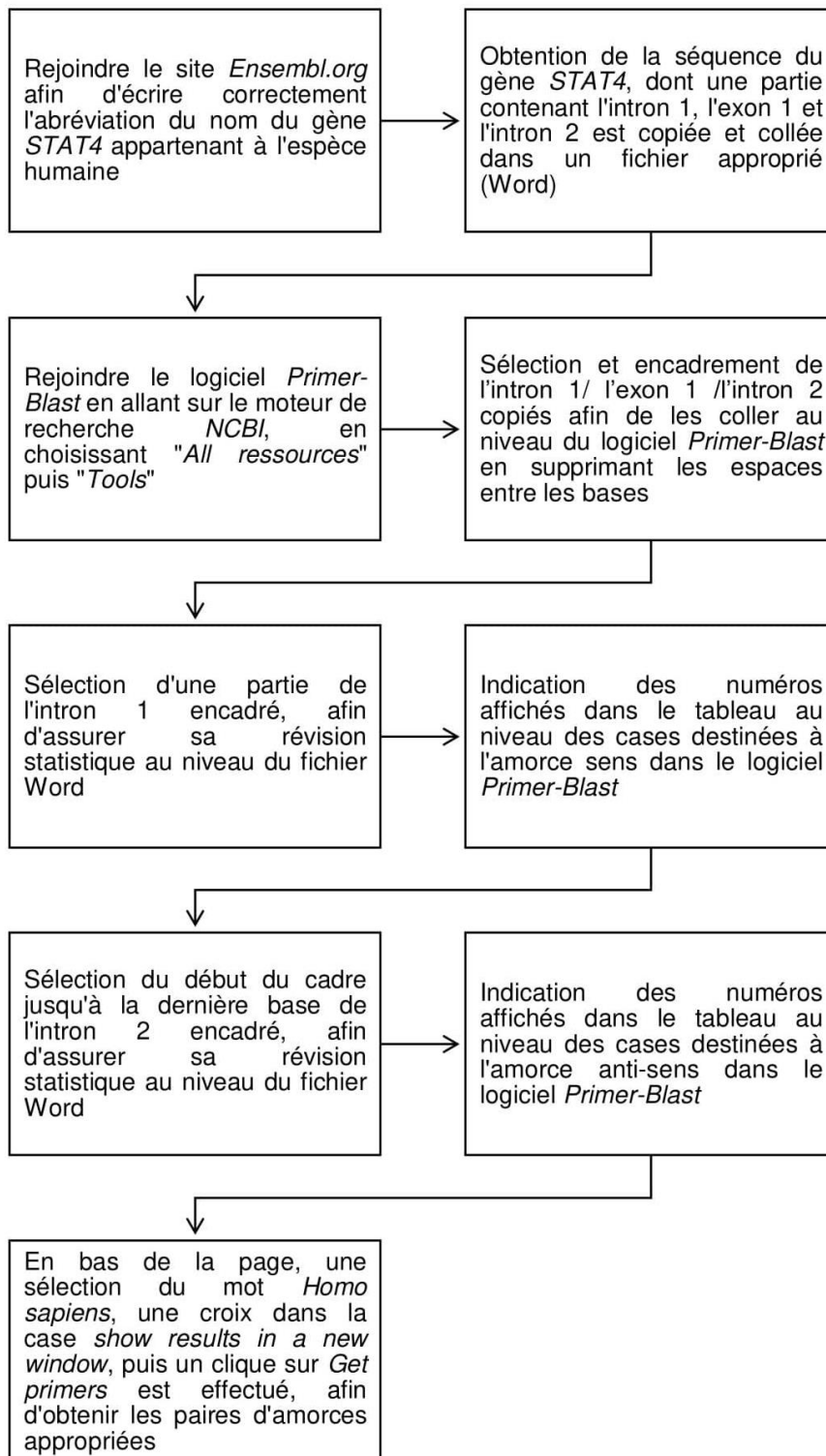


Figure 2.2. Étapes de sélection des amorces sens et anti-sens par l'utilisation d'*Ensembl.org*, *PubMed* et *Primer-Blast*.

Chapitre 3. Résultats

3.1 Résultats de la conception d'amorces

Dans un premier temps, des couples d'amorces ont été conçus, mais aboutissant à un produit aspécifique de moins de 1000 paires de bases (pb). Pour cela, la séquence à amplifier a été élargie, afin de fournir au logiciel un plus large choix de séquences pour les amorces, ce qui a permis d'obtenir un couple spécifique à la région sélectionnée.

Les amorces obtenues par les deux méthodes sont illustrées ci-dessous. (Figure 3.1. Figure 3.2.).

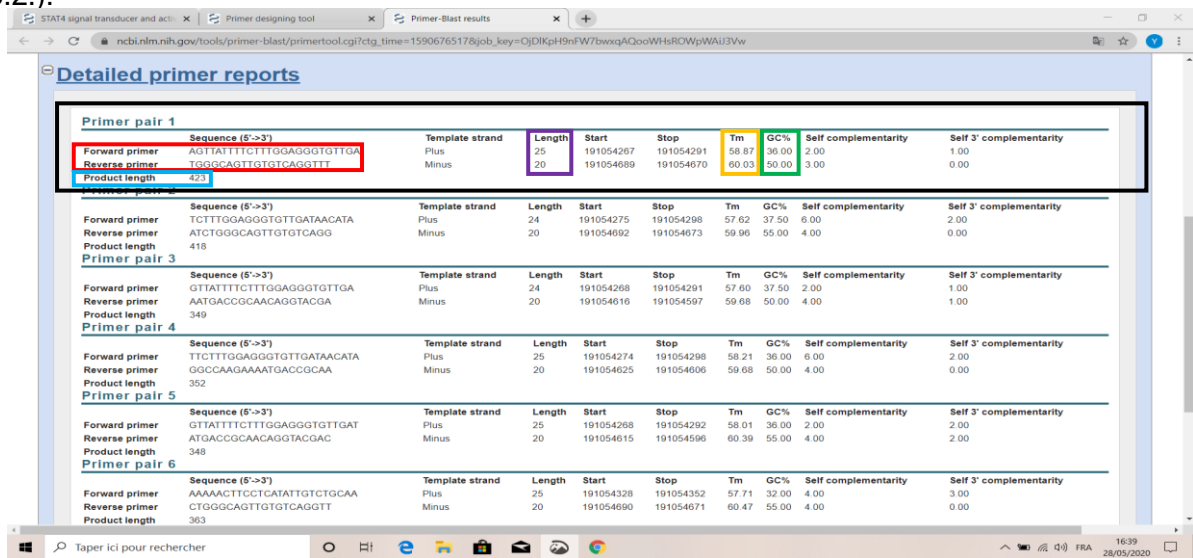


Figure 3.1. Résultats de la conception d'amorces sens et anti-sens par l'utilisation de PubMed et Primer-Blast.

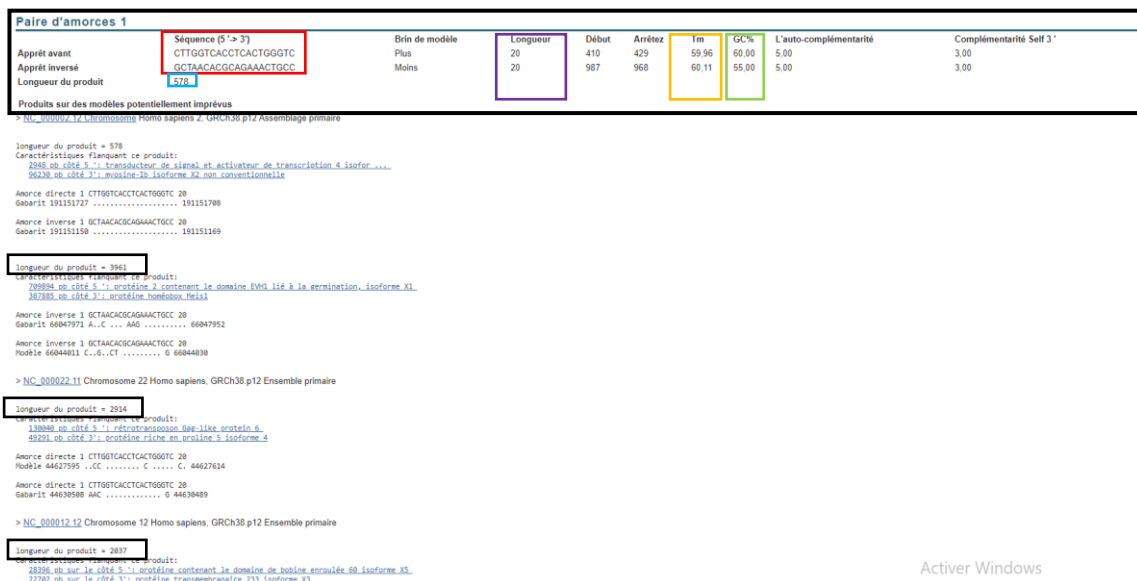


Figure 3.2. Résultats de la conception d'amorces sens et anti-sens par l'utilisation d'Ensembl.org, PubMed et Primer-Blast.

3.2 Confirmation des résultats

Afin de vérifier la fiabilité des amorces, une PCR virtuelle (*In-Silico PCR*) a été réalisée. Cela a été effectué à l'aide des étapes citées ci-après. (Figure 3.3).

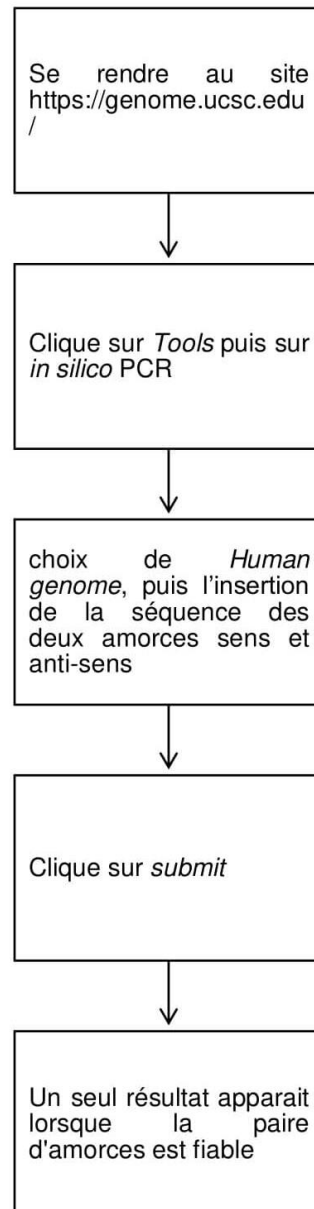


Figure 3.3. Etapes de confirmation des résultats obtenues.

Chapitre 4. Discussion

A l'aide des outils de la bio-informatique (PubMed NCBI, Ensembl.org, *In-Silico PCR*), nous avons pu réussir la conception de deux paires d'amorces du gène *STAT4*, situé sur le chromosome 2q33, et dont la mutation est associée à un polymorphisme ou à un effet pathogène, notamment l'apparition des maladies inflammatoires liées aux macrophages classiquement activés où le gène est exprimé.

A partir de la séquence du même gène *STAT4*, deux paires d'amorce ont été désignées avec leur taille, leur position, leur longueur, leur Tm, ainsi que leur teneur en GC. Ces paires d'amorces peuvent donc être utilisées en PCR à des fins d'essais d'amplification du gène *STAT4* au niveau des macrophages classiquement activés M1, proinflammatoires/tueur.

À partir d'une étude de polarisation *in vitro* utilisant des monocytes humains, il a été constaté que CD80 est le principal marqueur phénotypique des macrophages M1 humains polarisés par IFN- γ (Yao et al., 2019)

Ces cellules exprimant de nombreux médiateurs proinflammatoires (TNF- α , IL-1, IL-6, ROS et NO) conservent un statut homéostatique avec les macrophages résidents dans les tissus affectés, elles sont caractérisées par une forte activité microbicide et tumoricide. Cependant, si leur réponse inflammatoire ne peut pas être rapidement contrôlée, une tempête de cytokines se forme, contribuant ainsi à l'apparition de nombreuses pathologies, notamment l'infarctus du myocarde, et le cancer, en créant un environnement inflammatoire, et favorisant la croissance tumorale. Lorsque les tumeurs évoluent vers une tumeur maligne, les TAM contribuent à l'angiogenèse, à l'invasion, et à la métastase des tumeurs (Liu et al., 2014).

L'expression du phénotype M1 est également observée dans la PR, la goutte et l'arthrose (Laria et al., 2016), ainsi que dans le col de l'utérus des femmes en travail prématuré, elle est donc considérée comme associée à une naissance prématurée (Yao et al., 2019).

Fait important, notre laboratoire BIOMOLIM, dirigé par Pr.ARIBI, a été le premier au monde à avoir exploré le rôle de la vitamine D sur la modulation de cytokines par les PBMC, et l'activation de *STAT4* et *STAT6* dans les monocytes chez l'homme avec un diabète d'apparition récente (Ysmaïl-Dahlouk et al., 2016b).

Chapitre 5. Conclusions et perspectives

Compte-tenu du rôle prépondérant que jouent la PCR qualitative et la PCR quantitative (RT-qPCR) en tant qu'outils de biologie moléculaire, appliquée dans divers disciplines biologiques comme l'immunologie, la biologie cellulaire, la physiologie, la génétique, etc., il s'avère important d'élaborer des amorces qui soient les plus spécifiques et les moins biaisés possibles quant à la qualité d'hybridation et la température utilisée.

C'est dans ce sens que nous avons jugé intéressant de concevoir des amorces pour le gène *STAT4* dont le produit au niveau des macrophages M1 joue un rôle reconnu dans la survenue des maladies inflammatoires.

L'étude de son expression génique consiste à utiliser des amorces bien spécifiques, afin de pouvoir amplifier la région en question. Ceci représente une étape préalable et indispensable à toute analyse de biologie moléculaire.

Dans ce travail, nous avons élaboré deux couples d'amorces spécifiques au gène *STAT4*, à l'aide de PubMed NCBI et d'ensembl.org. D'autres méthodes peuvent être utilisées pour des fins de conceptions d'amorces, notamment Primer-3. Cela pourrait faire l'objet dans l'avenir d'application de *STAT4* dans le phénotypage des activités fonctionnelles des macrophages M1 dans différentes pathologies, y compris les maladies inflammatoires, les lésions tissulaires, et le développement tumoral.

Chapitre 6. Bibliographie

- Alomari, M., Almohazey, D., Almoftly, S.A., Khan, F.A., Al hamad, M., and Ababneh, D. (2019). Role of Lipid Rafts in Hematopoietic Stem Cells Homing, Mobilization, Hibernation, and Differentiation. *Cells* 8, 630.
- Aribi, M. (2018). Macrophage Bactericidal Assays. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1784, 135–149.
- Atri, C., Guerfali, F.Z., and Laouini, D. (2018). Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 19.
- Bastos, K.R.B., Marinho, C.R.F., Barboza, R., Russo, M., Alvarez, J.M., and D’Império Lima, M.R. (2004). What kind of message does IL-12/IL-23 bring to macrophages and dendritic cells? *Microbes Infect.* 6, 630–636.
- Burg, A.R., and Tse, H.M. (2018). Redox-Sensitive Innate Immune Pathways During Macrophage Activation in Type 1 Diabetes. *Antioxid. Redox Signal.* 29, 1373–1398.
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., and Zhao, L. (2018). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* 9, 7204–7218.
- Colafrancesco, S., Ciccacci, C., Priori, R., Latini, A., Picarelli, G., Arienzo, F., Novelli, G., Valesini, G., Perricone, C., and Borgiani, P. (2019). STAT4, TRAF3IP2, IL10, and HCP5 Polymorphisms in Sjögren’s Syndrome: Association with Disease Susceptibility and Clinical Aspects. *J. Immunol. Res.* 2019, 7682827.
- Dalmas, É., and Venteclef, N. (2015). Les macrophages: Nouveaux modulateurs de la répartition de la masse grasse au cours de l’obésité. *Médecine/Sciences* 31, 1080–1082.
- Eaves, C.J. (2015). Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood* 125, 2605–2613.
- Fu, C., Jiang, L., Xu, X., Zhu, F., Zhang, S., Wu, X., Liu, Z., Yang, X., and Li, S. (2016). STAT4 knockout protects LPS-induced lung injury by increasing of MDSC and promoting of macrophage differentiation. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 223, 16–22.
- Fu, Y., Cheng, Y., and Wu, Y. (2020). Understanding SARS-CoV-2-Mediated Inflammatory Responses: From Mechanisms to Potential Therapeutic Tools. *Viol. Sin.*
- Garibyan, L., and Avashia, N. (2013). Polymerase Chain Reaction. *J. Invest. Dermatol.* 133, 1–4.
- Gordon, S., and Martinez-Pomares, L. (2017). Physiological roles of macrophages. *Pflugers Arch.* 469, 365–374.
- Green, M.R., and Sambrook, J. (2018). The Basic Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb. Protoc.* 2018, pdb.prot095117.

Bibliographie

- Kielbassa, K., Vegna, S., Ramirez, C., and Akkari, L. (2019). Understanding the Origin and Diversity of Macrophages to Tailor Their Targeting in Solid Cancers. *Front. Immunol.* *10*, 2215.
- Knudsen, N.H., and Lee, C.-H. (2013). STAT4: An Initiator of Meta-Inflammation in Adipose Tissue? *Diabetes* *62*, 4002–4003.
- Laria, A., Lurati, A., Marrazza, M., Mazzocchi, D., Re, K.A., and Scarpellini, M. (2016). The macrophages in rheumatic diseases. *J. Inflamm. Res.* *9*, 1–11.
- Lee, J., Yoon, S., Choi, I., and Jung, H. (2019). Causes and Mechanisms of Hematopoietic Stem Cell Aging. *Int. J. Mol. Sci.* *20*, 1272.
- Lee, Y.K., Landuyt, A.E., Lobionda, S., Sittipo, P., Zhao, Q., and Maynard, C.L. (2017). TCR-independent functions of Th17 cells mediated by the synergistic actions of cytokines of the IL-12 and IL-1 families. *PloS One* *12*, e0186351.
- Liu, Y.-C., Zou, X.-B., Chai, Y.-F., and Yao, Y.-M. (2014). Macrophage polarization in inflammatory diseases. *Int. J. Biol. Sci.* *10*, 520–529.
- McGrath, K.E., Frame, J.M., and Palis, J. (2015). Early hematopoiesis and macrophage development. *Semin. Immunol.* *27*, 379–387.
- Mendoza-Reinoso, V., Baek, D.Y., Kurutz, A., Rubin, J.R., Koh, A.J., McCauley, L.K., and Roca, H. (2020). Unique Pro-Inflammatory Response of Macrophages during Apoptotic Cancer Cell Clearance. *Cells* *9*.
- Merad, M., and Martin, J.C. (2020). Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* *20*, 355–362.
- Mitchell, T.J., and John, S. (2005). Signal transducer and activator of transcription (STAT) signalling and T-cell lymphomas. *Immunology* *114*, 301–312.
- Murray, P.J. (2017). Macrophage Polarization. *Annu. Rev. Physiol.* *79*, 541–566.
- Nageeb, R.S., Omran, A.A., Nageeb, G.S., Yousef, M.A., Mohammad, Y.A.A., and Fawzy, A. (2018). STAT4 gene polymorphism in two major autoimmune diseases (multiple sclerosis and juvenile onset systemic lupus erythematosus) and its relation to disease severity. *Egypt. J. Neurol. Psychiatry Neurosurg.* *54*, 16.
- Nahrendorf, M., and Swirski, F.K. (2016). Abandoning M1/M2 for a Network Model of Macrophage Function. *Circ. Res.* *119*, 414–417.
- Orecchioni, M., Ghosheh, Y., Pramod, A.B., and Ley, K. (2019). Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Front. Immunol.* *10*, 1084.
- Pinho, S., and Frenette, P.S. (2019). Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *20*, 303–320.
- Seita, J., and Weissman, I.L. (2010). Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation: Hematopoietic stem cell. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* *2*, 640–653.

Bibliographie

- Shaheen, M., and Broxmeyer, H.E. (2018). Cytokine/Receptor Families and Signal Transduction. In *Hematology*, (Elsevier), pp. 163–175.
- Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S.-A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J.T., and Sahebkar, A. (2018a). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell. Physiol.* *233*, 6425–6440.
- Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S.-A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J.T., and Sahebkar, A. (2018b). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell. Physiol.* *233*, 6425–6440.
- Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S.-A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J.T., and Sahebkar, A. (2018c). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell. Physiol.* *233*, 6425–6440.
- Shi, H., He, H., Ojha, S.C., Sun, C., Fu, J., Yan, M., Deng, C., and Sheng, Y. (2019). Association of STAT3 and STAT4 polymorphisms with susceptibility to chronic hepatitis B virus infection and risk of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Biosci. Rep.* *39*.
- Tay, M.Z., Poh, C.M., Rénia, L., MacAry, P.A., and Ng, L.F.P. (2020). The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat. Rev. Immunol.* *20*, 363–374.
- Thornley, T.B., Agarwal, K.A., Kyriazis, P., Ma, L., Chipashvili, V., Aker, J.E., Korniotis, S., Csizmadia, E., Strom, T.B., and Koulmanda, M. (2016). Contrasting Roles of Islet Resident Immunoregulatory Macrophages and Dendritic Cells in Experimental Autoimmune Type 1 Diabetes. *PloS One* *11*, e0150792.
- Trouplin, V., Boucherit, N., Gorvel, L., Conti, F., Mottola, G., and Ghigo, E. (2013). Bone marrow-derived macrophage production. *J. Vis. Exp. JoVE* e50966.
- Tsao, B.P., and Deng, Y. (2011). Constitutive Genes and Lupus. In *Systemic Lupus Erythematosus*, (Elsevier), pp. 47–61.
- Ueno, H. (2020). The IL-12-STAT4 axis in the pathogenesis of human systemic lupus erythematosus. *Eur. J. Immunol.* *50*, 10–16.
- Uhel, F., Zafrani, L., and Commission de la recherche translationnelle de la Société de réanimation de langue française (2019). *Nouvelles techniques de biologie moléculaire. Médecine Intensive Réanimation*.
- Upadhyay, R., Dua, B., Sharma, B., Natrajan, M., Jain, A.K., Kithiganahalli Narayanaswamy, B., and Joshi, B. (2019). Transcription factors STAT-4, STAT-6 and CREB regulate Th1/Th2 response in leprosy patients: effect of *M. leprae* antigens. *BMC Infect. Dis.* *19*, 52.
- Van Laethem, F., Saba, I., Tikhonova, A.N., and Singer, A. (2014). [Crucial role of CD4 and CD8 coreceptors in antigen recognition of $\alpha\beta$ T lymphocytes]. *Med. Sci. MS* *30*, 511–513.
- Villarino, A.V., Kanno, Y., and O’Shea, J.J. (2017). Mechanisms and consequences of Jak-STAT signaling in the immune system. *Nat. Immunol.* *18*, 374–384.
- Wang, Y., Qu, A., and Wang, H. (2015). Signal transducer and activator of transcription 4 in liver diseases. *Int. J. Biol. Sci.* *11*, 448–455.

Bibliographie

- Watford, W.T., Hissong, B.D., Bream, J.H., Kanno, Y., Muul, L., and O'Shea, J.J. (2004). Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4. *Immunol. Rev.* *202*, 139–156.
- Wu, M.-Y., and Lu, J.-H. (2019). Autophagy and Macrophage Functions: Inflammatory Response and Phagocytosis. *Cells* *9*.
- Wu, S., Wang, M., Wang, Y., Zhang, M., and He, J.-Q. (2018). Polymorphisms of the STAT4 gene in the pathogenesis of tuberculosis. *Biosci. Rep.* *38*.
- Wynn, T.A., and Vannella, K.M. (2016a). Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* *44*, 450–462.
- Wynn, T.A., and Vannella, K.M. (2016b). Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* *44*, 450–462.
- Wynn, T.A., Chawla, A., and Pollard, J.W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* *496*, 445–455.
- Yang, R., Yang, E., Shen, L., Modlin, R.L., Shen, H., and Chen, Z.W. (2018). IL-12+IL-18 Cosignaling in Human Macrophages and Lung Epithelial Cells Activates Cathelicidin and Autophagy, Inhibiting Intracellular Mycobacterial Growth. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *200*, 2405–2417.
- Yao, Y., Xu, X.-H., and Jin, L. (2019). Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. *Front. Immunol.* *10*, 792.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., and Madden, T.L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* *13*, 134.
- Ysmail-Dahlouk, L., Nouari, W., and Aribi, M. (2016a). 1,25-dihydroxyvitamin D3 downmodulates the production of proinflammatory cytokines and nitric oxide and enhances the phosphorylation of monocyte-expressed STAT6 at the recent-onset type 1 diabetes. *Immunol. Lett.* *179*, 122–130.
- Ysmail-Dahlouk, L., Nouari, W., and Aribi, M. (2016b). 1,25-dihydroxyvitamin D3 downmodulates the production of proinflammatory cytokines and nitric oxide and enhances the phosphorylation of monocyte-expressed STAT6 at the recent-onset type 1 diabetes. *Immunol. Lett.* *179*, 122–130.

Résumé

Introduction : La défense immunitaire contre les agents infectieux repose sur le bon fonctionnement du système immunitaire (SI) ; composé de diverses cellules, y compris les macrophages (MØ), impliqués dans l'inflammation et l'homéostasie tissulaire. Leur plasticité est nécessaire à leur changement phénotypique lorsqu'ils sont issus de monocytes (MO) sanguins en inflammation, où le profil classiquement activé (M1) assure l'immunité cellulaire suite à l'action des agents pathogènes via le transducteur de signal et l'activateur de transcription 4 (STAT4), activé principalement par l'interleukine-12 (IL-12), conduisant à l'expression de gènes cibles, notamment ceux codants l'interféron-gamma (IFN- γ).

Le polymorphisme du gène *STAT4* peut être associé à de nombreuses anomalies impliquant les MØ M1 ; l'étude de son expression s'est avérée dans ce cas cruciale pour la mise en évidence de ces pathologies, et nécessite donc la réalisation d'une PCR de ce gène.

Objectif : Conception des amorces du gène *STAT4*.

Matériel et méthodes : J'ai mené un travail d'immunoinformatique, dans lequel j'ai utilisé en premier lieu le moteur de recherche de données bibliographiques PubMed, afin de choisir le gène *STAT4* pour concevoir ses amorces en utilisant l'outil Primer-Blast appartenant à la même base, afin d'obtenir diverses propositions de paires d'amorces appropriées.

En deuxième lieu, j'ai pris la séquence du gène *STAT4* à partir de la plateforme Ensembl.org, afin de concevoir ses amorces par Primer-Blast en passant par le Word.

Résultats : L'outil Primer-Blast m'a permis d'obtenir deux couples d'amorces spécifiques au gène *STAT4*, qui répondent aux critères d'une meilleure paire nécessaire au bon fonctionnement d'une PCR, une première (amorce sens (AGTTATTTTCTTTGGAGGGTGTGA, 25pb, 58°C, et 36%GC), amorce anti-sens (TGGGCAGTTGTGTCAGGTTT, 20pb, 60°C, et 50%GC)), et une deuxième (amorce sens (CTTGGTCACCTCACTGGGTC, 20pb, 59°C, et 60%GC), amorce anti-sens (GCTAACACGCAGAACTGCC, 20pb, 60°C, et 55%GC)). Afin de vérifier leur fiabilité, j'ai réalisé une PCR virtuelle en allant sur *in-silico* PCR.

Discussion : A l'aide des outils de la bioinformatique, j'ai pu réussir la conception de deux paires d'amorces spécifiques au gène *STAT4*, ayant l'avantage d'être stables avec des propriétés adaptées aux protocoles expérimentaux comme la PCR.

Conclusions et perspectives : J'ai pu élaborer deux paires d'amorces spécifiques au gène *STAT4* en utilisant deux méthodes différentes. D'autres techniques peuvent être appliquées pour des fins similaires, notamment Primer-3.

Cela pourrait faire l'objet dans l'avenir d'application de *STAT4* dans le phénotypage des activités fonctionnelles des macrophages M1 dans différentes pathologies.

Mots clés : Macrophage proinflammatoire- *STAT4*- PCR- amorces.

Abstract

Background : Immune defense against infectious agents is based on the proper functioning of the immune system (IS); composed of various cells, including macrophages (MØ), involved in inflammation and tissue homeostasis.. Their plasticity is necessary for their phenotypic change when they are derived from blood monocytes (MO) in inflammation, where the profile classically activated (M1) provides cellular immunity following the action of pathogens via signal transducer and transcription activator 4 (STAT4), activated primarily by interleukin-12 (IL-12), leading to the expression of target genes, including interferon-gamma-encoding genes (IFN- γ).

The polymorphism of the *STAT4* gene can be associated with numerous abnormalities involving MØ M1; the study of its expression has proved crucial in this case for the identification of these pathologies, and therefore requires the realization of a PCR of this gene.

Objective: Design of *STAT4* gene primers.

Materials and methods: I carried out an immunoinformatics work, in which I first used the PubMed bibliographic data search engine, in order to choose the *STAT4* gene to design its primers using the tool Primer-Blast belonging to the same base, in order to obtain various proposals for appropriate primer pairs. Second, I took the sequence of the *STAT4* gene from the Ensembl.org platform, in order to design its primers by Primer-Blast through Word.

Results: The Primer-Blast tool allowed me to obtain two pairs of primers specific to the *STAT4* gene, which meet the criteria of a better pair necessary for the proper functioning of a PCR, first (forward primer (AGTTATTTTCTTTGGAGGGTGTGA, 25pb, 58°C, and 36%GC), reverse primer (TGGGCAGTTGTGTCAGGTTGTTGTT, 20pb, 60°C, and 50%GC)), and second (forward primer (CTTGGTCACCTCACTGGGTC, 20pb, 59°C, and 60%GC), reverse primer (GCTAACACGCAGAACTGCC, 20pb, 60°C, and 55%GC)). In order to check their reliability, I made a virtual PCR by going on *in-silico* PCR.

Discussion: Using the tools of bioinformatics, I was able to successfully design two pairs of primers specific to the *STAT4* gene, having the advantage of being stable with properties adapted to experimental protocols such as PCR.

Conclusions and perspectives: I was able to develop two pairs of primers specific to the *STAT4* gene using two different methods. Other techniques may be used for similar purposes, such as Primer-3. This could be the subject in the future of application of *STAT4* in the phenotyping of functional activities of M1 macrophages in different pathologies.

Keywords: Proinflammatory macrophage- *STAT4*- PCR-primers.

