

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة أبو بكر بلقايد – تلمسان
Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMEN
كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون
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 Immunologie



MÉMOIRE

Présenté par

CHERIF Mohamed Chakib
MOLINOUSana

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Immunologie

Thème

Conception des amorces pour le gène *GATA3* exprimé par les cellules lymphoïdes innées type 2 (ILC2s) au cours des infections parasitaires

Soutenu le 19 juin 2022, devant le jury composé de :

Présidente	BRAHAMI Nabila	MCA	Université de Tlemcen
Encadrante	NOUARI Wafa	MCB	Université de Tlemcen
Examinatrice	MILIANI Maroua	MCB	Université de Tlemcen

Année universitaire 2021/2022

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة أبو بكر بلقايد – تلمسان
Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEM
كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون
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 Immunologie



MÉMOIRE

Présenté par

CHERIF Mohamed Chakib
MOLINOUSana

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Immunologie

Thème

Conception des amorces pour le gène *GATA3* exprimé par les cellules lymphoïdes innées type 2 (ILC2s) au cours des infections parasitaires

Soutenu le 19 juin 2022, devant le jury composé de :

Présidente	BRAHAMI Nabila	MCA	Université de Tlemcen
Encadrante	NOUARI Wafa	MCB	Université de Tlemcen
Examinatrice	MILIANI Maroua	MCB	Université de Tlemcen

Année universitaire 2021/2022

Résumé

Introduction : Les cellules lymphoïdes innées (ILCs) sont des cellules qui jouent un rôle très important dans la défense contre les infections, notamment les infections parasitaires. Ces cellules se caractérisent par l'expression d'une large batterie de facteurs de transcription et la production d'une variété de cytokines impliquées dans les réponses anti-infectieuses et anti-inflammatoires. Le facteur de transcription GATA3 est un facteur clé qui permet la régulation de la différenciation et le maintien des ILC2s.

Objectif : L'élaboration des séquences d'oligonucléotides qui serviront d'amorces à l'amplification de l'exon 1 du gène *GATA3* par PCR.

Matériel et méthodes : afin de concevoir des amorces spécifiques du gène *GATA3*, nous avons utilisé des outils de bio-informatique. La base de données www.ensembl.org a été utilisée pour rechercher des séquences spécifiques du gène *GATA3* et l'outil Primer-BLAST fourni par NCBI a été utilisé pour concevoir des amorces. Les résultats ont été confirmés par PCR *in silico*.

Résultats : L'utilisation de L'outil Primer-BLAST a permis d'obtenir une amorce spécifique au gène *GATA3* à savoir : Forward primer «GCTGTTTCTCCTTCCCTCCC», Réverse primer «CCACACACTCACACACCGTA» avec un produit spécifique de 499 Pb, Tm (Forward primer 60,03°C, Reverse primer : 59,90°C), la teneur en GC est de 60% Pour l'amorce sens et 55% pour l'anti-sens et une longueur de 20 nucléotides pour les deux amorces.

Conclusion : Concevoir une bonne paire d'amorces aide à réussir la technique PCR, et donc l'amplification correcte du gène *GATA3* et l'étude de son rôle au cours des infections parasitaires.

Mots clé : amorces, *GATA3*, ILC2, parasites, Primer-BLAST.

Abstract

Introduction : Innate lymphoid cells (ILCs) are cells that play a very important role in the defense against infections, especially parasitic infections. These cells are characterized by the expression of a large battery of transcription factors and the production of a variety of cytokines involved in anti-infectious and anti-inflammatory responses. The transcription factor GATA3 is a key factor that regulates the differentiation and maintenance of ILC2s.

Objective : Development of oligonucleotide sequences to be used as primers for the amplification of the exon 1 of *GATA3* gene by PCR.

Materials and methods : In order to design primers specific to the *GATA3* gene, we used bioinformatics tools. The database www.ensembl.org was used to search for specific sequences of the *GATA3* gene and the Primer-BLAST tool provided by NCBI was used to design primers. The results were confirmed by *in silico* PCR.

Results: The use of the Primer-BLAST tool allowed us to obtain a specific primer for the *GATA3* gene: Forward primer «GCTGTTTCTCCCTCCC», Reverse primer «CCACACA CTCACACACCGTA » with a specific product of 499 Pb, T_m (Forward primer 60,03°C, Reverse primer: 59,90°C), the GC content is 60% for the sense primer and 55% for the anti-sense primer and a length of 20 nucleotides for both primers.

Conclusions: Designing a good primer pair helps the PCR technique succeed, and thus the correct amplification of the *GATA3* gene and the study of its role during parasitic infections.

Keywords : *GATA3*, ILC2, parasites, Primers, Primer-BLAST,

المخلص

مقدمة: الخلايا اللمفاوية الفطرية (ILC2s) هي الخلايا التي تلعب دورًا مهمًا جدًا في الدفاع ضد الالتهابات، وخاصة الالتهابات الطفيلية. تتميز هذه الخلايا بالتعبير عن مجموعة كبيرة من عوامل النسخ وإنتاج مجموعة متنوعة من السيتوكينات المشاركة في الاستجابات المضادة للعدوى والمضادة للالتهابات. عامل النسخ *GATA3* هو عامل رئيسي ينظم تمايز وصيانة (ILC2s).

الهدف: تطوير تسلسل قليل النوكليوتيد لاستخدامه كأساس لتضخيم جين *GATA3* بواسطة تفاعل البوليميراز المتسلسل.

المواد والطرق: من أجل تصميم بادئات خاصة بجين *GATA3*، استخدمنا أدوات المعلوماتية الحيوية. قاعدة البيانات. تم استخدام www.ensemble.org للبحث عن تسلسلات محددة من جين *GATA3* واستخدمت أداة Primer-BLAST التي يوفرها NCBI لتصميم البادئات. تم تأكيد النتائج في *PCR in silico*.

النتائج: سمح لنا استخدام أداة Primer-BLAST بالحصول على أساس محدد لجين *GATA3*: التمهيدي الأمامي GCTGTTTCTCCCTCCC، التمهيدي العكسي CCACACTCACACACCGTA مع منتج محدد من 499 Pb، Tm (التمهيدي الأمامي 60.03 درجة مئوية، التمهيدي العكسي: 59.90 درجة مئوية)، محتوى GC هو 60% لبادئ الحس و55% للبادئ المضاد للحس وطول 20 نوكليوتيدات لكلا البادئين.

الاستنتاجات: تصميم زوج تمهيدي جيد يساعد على نجاح تقنية PCR، وبالتالي التضخيم الصحيح لجين *GATA3* ودراسة دوره أثناء العدوى الطفيلية.

الكلمات المفتاحية: ILC2، *GATA3*، طفيليات، برايمر بلاست، مواد أولية.

Avant-propos

Tout d'abord, nous remercions Dieu tout-puissant de nous avoir guidés et de nous avoir donné la force et le courage de terminer nos études.

Ce travail est réalisé au niveau du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et d'Immunologie à l'Université de Tlemcen (BIOMOLIM), sous la direction du Pr ARIBI Mourad.

Au terme de ce mémoire, nous tenons à exprimer nos remerciements les plus sincères à notre encadrante Dr. NOUARI Wafa maître de conférences de classe B au département de Biologie- Université de Tlemcen. Merci beaucoup pour votre aide, votre disponibilité, votre dynamisme et votre rigueur scientifique et vos précieux conseils.

Nous tenons également à remercier les membres du jury qui nous ont fait l'honneur d'ausculter notre mémoire à savoir Dr. BRAHAMI Nabila Maître de conférences de classe A (Université de Tlemcen) et Dr. MILIANI Marwa Maître de conférences de classe B (Université de Tlemcen).

Je tiens également à remercier mes parents et mes frères qui m'ont toujours aidé et soutenu.

Je dédie cet humble travail à ceux qui m'ont soutenu et abreuvé tout au long de ma vie tendresse et amour à ma très chère mère.

Pour mon soutien vital, pour l'homme qui m'a guidé et soutenu à mon père.

À mes frères Yacine et Walid, et à toute ma famille.

À mes chers amis A. Ikram, Z. Kawter, D. Meriem.

Sana

Je dédie ce travail à :

Mes parents, ma sœur et mon frère, et à toute ma famille.

Ma très chère mère, qui est mon symbole de force et de courage.

Mon idole dans la vie, mon père.

À mon frère et ma sœur. Je leur remercie pour tout le soutien et l'amour qu'ils me portent et qu'Allah les garde pour moi.

À mes chers amis Z. Abdellah, S. Youcef, B. Sidi Mohammed Ghouti.

Chakib

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	III
Abstract	IV
Résumé en Arabe	V
Avant-propos	VI
Table des matières	VII
Liste des figures	X
Liste des abréviations	XI
Introduction	1
Chapitre 1. Revue de la littérature	2
1.1. Les cellules lymphoïdes innées	2
1.1.1. Historique	2
1.1.2. Développement	2
1.1.3. Sous populations	4
1.1.3.1. ILC de type 1	5
1.1.3.1. A. Les cellules cNK	5
1.1.3.1. B. ILC1	5
1.1.3.2. ILC de type 2	5
1.1.3.3. ILC de type 3	6
1.1.4. Plasticité	7
1.1.5. Fonctions des ILCs et cytokines produites	8
ILC1s	8
ILC2s	9
ILC3s	10
1.2. GATA3	11
1.2.1. Généralités	11
1.2.2. Membres de famille	11
1.2.3. Localisation et structure du gène <i>GATA3</i>	11
1.2.4. Fonction du <i>GATA3</i>	13
1.2.5. <i>GATA3</i> dans le développement et le fonctionnement des ILCs	15
1.2.5.1. Fonctions de <i>GATA3</i> dans les ILC1s	15
1.2.5.2. Fonctions de <i>GATA3</i> dans les ILC2s	15
1.2.5.3. Fonctions de <i>GATA3</i> dans les ILC3s	16
1.3. Infections parasitaires	17

1.3.1. Généralités	17
1.3.1.1. Protozoaires	17
1.3.1.2. Helminthe	17
1.3.1.3. Ectoparasites	18
1.3.2. Rôle des ILCs dans les infections parasitaires	18
1.3.2.1. Rôle des ILC1s	18
1.1.7.2. Rôle des ILC2s	20
1.4. PCR	22
1.4.1. Définition	22
1.4.2. Principe de la PCR	22
1.4.3. Les composants de la PCR	22
1.4.3.1. L'ADN	22
1.4.3.2. Les amorces	22
1.4.3.3. Les nucléotides	23
1.4.3.4. L'enzyme, Taq polymérase	24
1.4.3.5. Ions de Mg ²⁺	24
1.4.3.6. Le thermocycleur	24
1.4.4. Etapes de la PCR	24
1.4.4.1. La dénaturation	24
1.4.4.2. L'hybridation	25
1.4.4.3. L'élongation	25
1.5. Problématique et objectif	26
1.5.1. Problématique	26
1.5.2. Objectif	26
1.5.3. But	26
Chapitre 2. Matériels et méthodes	27
2.1. Conception des amorces	27
2.2. Conception des amorces pour amplifier le gène <i>GATA3</i>	28
2.2.1. Détermination de la séquence du gène <i>GATA3</i>	28
2.2.2. Le design des Primers : L'outil Primer-BLAST	31
2.2.3. Confirmation des résultats par In-Silico PCR	34
Chapitre 3. Résultats et discussions	35
3.1. Résultats de la conception des amorces	35
3.1.1. Résultats du Primer-BLAST	35
3.1.2. Résultats d'In-silico PCR	38
Chapitre 4. Conclusions et perspectives	39

Chapitre 5. Bibliographie

40

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Développement des cellules lymphoïdes innées.	4
Figure 1.2. Sous-types de cellules lymphoïdes innées (ILCs).	6
Figure 1.3. Plasticité des ILCs.	8
Figure 1.4. Localisation du gène <i>GATA3</i> sur le chromosome 10 humain.	12
Figure 1.5. Structure du gène <i>GATA3</i> .	12
Figure 1.6. Fonctions des facteurs GATA dans le développement hématopoïétique.	14
Figure 1.7. Rôle des ILC1s dans le contrôle de l'infection à <i>Toxoplasma gondii</i> .	19
Figure 1.8. Réponses immunitaires induites par les helminthes et médiées par les ILC2s.	21
Figure 1.9. Présentation schématique du principe de la PCR.	25
Figure 2.1. Plateforme de la base de données Ensembl.	29
Figure 2.2. Résultats de la recherche du gène <i>GATA3</i> .	29
Figure 2.3. Les caractéristiques du gène <i>GATA3</i> .	30
Figure 2.4. La séquence du gène <i>GATA3</i> par la plateforme Ensembl.	30
Figure 2.5. La séquence de l'exon 1 du gène <i>GATA3</i> .	31
Figure 2.6. Le site NCBI.	32
Figure 2.7. L'outil Primer-BLAST.	32
Figure 2.8. L'outil Primer-BLAST.	33
Figure 2.9. Paramètres de vérification de la spécificité des paires d'amorces (Primer Pair Specificity Checking Parameters).	33
Figure 2.10. Plateforme du site « genome.ucsc.edu ».	34
Figure 2.11. Le site <i>In-Silico</i> PCR.	34
Figure 3.1. Résultats du Primer-BLAST.	35
Figure 3.2. Primer pair 1.	35
Figure 3.3. Primer pair 4.	35
Figure 3.4. Résultats du Primer-BLAST.	36
Figure 3.5. Résultats du Primer-BLAST.	37
Figure 3.6. Les amorces encadrant la région d'intérêt.	37
Figure 3.7. Confirmation des résultats sur la plateforme « UCSC genome browser ».	38
Figure 3.8. Résultats de la confirmation.	38

Liste des abréviations

A

ADN : acide désoxyribonucléique
ADNsb : Acide désoxyribonucléique simple brin
ARN : acide ribonucléique
APC : cellules présentatrices d'antigène
AREG : l'amphireguline

C

CSH: cellule souche hématopoïétique
CMP : précurseur myéloïde commun
CLP : précurseur lymphoïde commun
CILP : common innate lymphoid progenitor
CHILP : common helper innate lymphoid progenitor
CMH II : complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CCL5 : CC chemokine ligand
CD27 : cluster of différenciation

D

DSS : sulfate de dextran sodium
DC : cellule dendritique
dNTP : Désoxy-nucléotides tri-phosphates

E

Eomes : Eomesodermin
EILP : progéniteurs lymphoïdes innés précoces
ETS1 : v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1

F

FLI1 : Friend leukemia integration 1

G

GATA3 : GATA binding protein 3
GFP : Green Fluorescent Protéine
GVHD : maladie du greffon contre l'hôte

I

ILCs : cellules lymphoïdes innées
ILCP : cellule lymphoïde innée précurseur
IL : Interleukine
IFN : Interféron
Il2rg : interleukin 2 receptor subunit gamma
IgE : Immunoglobuline E
Id2: inhibiteur de la liaison à l'ADN2

L

LTi: inducteurs des tissus lymphoïdes

M

M2 : Macrophage alternativement activé/anti-inflammatoire
MAA : macrophages activés alternatifs
Mg 2+ : Magnésium

N

NCBI : National Center for Biotechnology Information
NK : Natural killer
NFIL3 : facteur nucléaire interleukine 3-régulée

Nt : Nucléotide

P

PLZF : promyelocytic leukaemia zinc finger

PCR : Polymerase chain reaction

R

ROR γ t : Récepteur gamma orphelin lié aux récepteurs de l'acide rétinoïque

RT-PCR : Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

S

STAT : Transducteur de signal et activateur de transcription

T

T : Thymidine

Th1 : Lymphocyte T helper de type 1

Th2 : Lymphocyte T helper de type 2

Tm : Température de fusion (Melting Temperature)

TNF : Facteur de nécrose tumorale (Tumor necrosis factor)

TGF- β : Transforming Growth Factor-beta

T-bet : T-box-expressed-in-T -cells

Treg : cellule T régulatrice

Z

Zn : zinc

Introduction

Au cours de la dernière décennie, une nouvelle population de cellules impliquées dans l'immunité innée a été identifiée chez la souris puis confirmée chez l'homme. Ces cellules sont appelées cellules lymphoïdes innées (ou ILCs de cellules lymphoïdes innées). Ces cellules lymphoïdes se distinguent des lymphocytes B et T par l'absence de récepteurs antigéniques (Ignacio et al., 2017). En fonction de leurs caractéristiques phénotypiques et les cytokines qu'elles sécrètent, ces cellules se divisent en 3 groupes : ILC1s, ILC2s et ILC3s. Les ILC1s sont définies par l'expression des cytokines de type Th1, telles que l'interféron gamma (IFN- γ) et du facteur de transcription T-box-expressed-in-T-cells (T-bet). Les ILC2s se caractérisent par l'expression de l'interleukine 5 (IL-5) et l'IL-13 et le facteur de transcription GATA binding protein 3 (GATA3), impliqué dans les réponses immunitaires de type 2. Les ILC3s produisent l'IL-22 et de l'IL-17 intervenant dans le maintien de l'homéostasie intestinale et expriment le facteur RAR-related orphan receptor gamma t(ROR γ t) (Zheng and Zhu, 2022).

Le développement et le fonctionnement des ILCs nécessite le facteur de transcription GATA3 qui est une protéine appartenant à la famille des facteurs de transcription GATA et codé par le gène *GATA3*. Ce gène est un régulateur fondamental lors du développement des lymphocytes T (Rao et al. 2020). Il intervient également dans la régulation des fonctions d'ILC2s (Zhou, 2012).

Les ILCs contribuent à la défense immunitaire de première ligne contre plusieurs agents pathogènes, y compris les infections parasitaires par la production de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires (Spits et al., 2013b),

Dans cette d'ordre d'idées, notre travail consiste à élaborer des amorces qui serviront à amplifier la séquence d'oligonucléotides contenant le gène *GATA3* exprimé par les ILCs qui contribue à la lutte contre les infections parasitaires.

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.1. Les cellules lymphoïdes innées

1.1.1. Historique

La découverte des ILCs est récente au regard de toutes les recherches menées sur les cellules lymphoïdes depuis celle des leucocytes en 1843 par G. Andral et W. Addison (Crinier et al., 2017a). Ce n'est en effet qu'en 1975 que Kiessling et Herberman et leurs collaborateurs mirent en évidence la première population de cellules lymphocytaires innées: les cellules natural killer (NK) (Herberman et al., 1975). Par la suite, en 1997, Mebius et ses collaborateurs ont montré l'existence d'une seconde population lymphocytaire innée, les lymphoid fabric-inducing cells (LTi) (Crinier et al., 2017a).

Dans les années 2008 à 2010, une dizaine d'équipes rapportait simultanément l'existence des cellules lymphoïdes jusqu'alors inconnues, diversement nommées cellules natural killer(NK) 22, récepteur orphelin lié au récepteur de l'acide rétinoïque (ROR γ t), NKp46⁺, NK⁻ LTi, nuocytes ou Natural Helper cells (Narni-Mancinelli et al., 2011). Le terme de cellules lymphoïdes innées, basé sur l'aspect cytologique et phénotypique des cellules, a été utilisé pour la 1^{ère} fois par Buonocore en 2010 (Buonocore et al., 2010). Sur la base de leurs caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles, Spitz a proposé en 2013, une uniformisation de leur nomenclature qui fait consensus à ce jour (Spits et al., 2013a).

1.1.2. Développement

Dans la moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques sont à l'origine des deux principales branches hématopoïétiques, la lignée myéloïde et la lignée lymphoïde, représentées respectivement par le précurseur myéloïde commun (CMP) et le précurseur lymphoïde commun (CLP) (Klose and Artis, 2020). Le CLP est phénotypiquement défini comme des cellules CD127⁺ (IL-7R α +) Flt3⁺ c-Kit^{int} Sca-1^{int} dans des cellules lignées négatives (Lin⁻), illustrant l'importance de l'IL-7 pour le développement de la lignée lymphoïde et la génération de lymphocytes innés et adaptatifs (Schlenner et al., 2010). Le développement des lymphocytes innés et adaptatifs divergent après le stade CLP et peut définir des cellules précurseurs (sont des précurseurs) engagées qui ont encore la potentielle multi-lignée de différentes lignées des ILCs, mais pas les lymphocytes adaptatifs (figure 1.1) (Yang et al., 2015).

Le stade le plus précoce de ces précurseurs innés engagés, appelé précurseur ILC précoce EILP (*early innate lymphoid progenitors*), est défini par l'expression du facteur 1 des

cellules T (TCF-1, *T cells facteur 1*) et a le potentiel de donner naissance à tous les sous-ensembles des ILCs (Yang et al., 2015). L'EILP expriment faiblement l'IL-7R α , tandis que les progéniteurs lymphocytaires communs en amont (CLP) et les précurseurs en aval l'expriment fortement. Néanmoins, EILP s'est avéré être en amont des précurseurs ultérieurs plutôt qu'une voie alternative pour le développement des ILCs (Harly et al., 2018). La modulation de l'IL-7R α au cours du développement n'est pas liée aux lymphocytes, car les thymocytes doublement négatifs ont une expression élevée de l'IL-7R α jusqu'à ce qu'elle soit régulée négativement au stade double positif, puis à nouveau régulée positivement dans les thymocytes positifs simples (Klose and Artis, 2020).

Le progéniteur ILC de type helper commun (CHILP) est défini par un phénotype de surface similaire au CLP, y compris l'expression de l'interleukine-7 R-alpha (l'IL-7R α) et l'intégrine ($\alpha 4\beta 7$), l'absence de CD93 et Flt3, et l'expression du répresseur transcriptionnel ID2 (Klose et al., 2014). L'analyse des souris déficientes en ID2 a révélé que ces souris manquaient de tous les sous-ensembles des ILCs et avaient un défaut de maturation des cellules NK (Boos et al., 2007). À partir des cellules CHILP, un nouvel embranchement sépare le lignage des LTI de celui des autres ILCs, les ILCP (ILC précurseur) qui commencent à exprimer le facteur de transcription leucémie promyélocytaire doigt de zinc (PLZF) (Constantinides et al., 2014). Contrairement aux CHILP, les ILCP ne se différencient plus en LTI (Constantinides et al., 2014).

La cellule progénitrice PLZF⁺ avait un phénotype similaire au CHILP mais n'avait pas le potentiel de donner naissance aux ILC3 CCR6⁺. Plusieurs approches, y compris le séquençage unicellulaire, ont confirmé l'existence et le potentiel de précurseurs ILC multi-lignées et ont révélé des marqueurs supplémentaires, tels que PD-1, qui est fortement exprimé sur les précurseurs PLZF⁺ ILC (ILCP) (Harly et al., 2019), que vont se différencier les ILCs.

Le stade le plus précoce de ces précurseurs innés engagés, appelé précurseur ILC précoce EILP (*early innate lymphoid progenitors*), est défini par l'expression du facteur 1 des cellules T (TCF-1, *T cells facteur 1*) et a le potentiel de donner naissance à tous les sous-ensembles des ILCs (Yang et al., 2015). L'EILP expriment faiblement l'IL-7R α , tandis que les progéniteurs lymphocytaires communs en amont (CLP) et les précurseurs en aval l'expriment fortement. Néanmoins, EILP s'est avéré être en amont des précurseurs ultérieurs plutôt qu'une voie alternative pour le développement des ILCs (Harly et al., 2018). La modulation de l'IL-7R α au cours du développement n'est pas liée aux lymphocytes, car les thymocytes doublement négatifs ont une expression élevée de l'IL-7R α jusqu'à ce qu'elle soit

régulée négativement au stade double positif, puis à nouveau régulée positivement dans les thymocytes positifs simples (Klose and Artis, 2020).

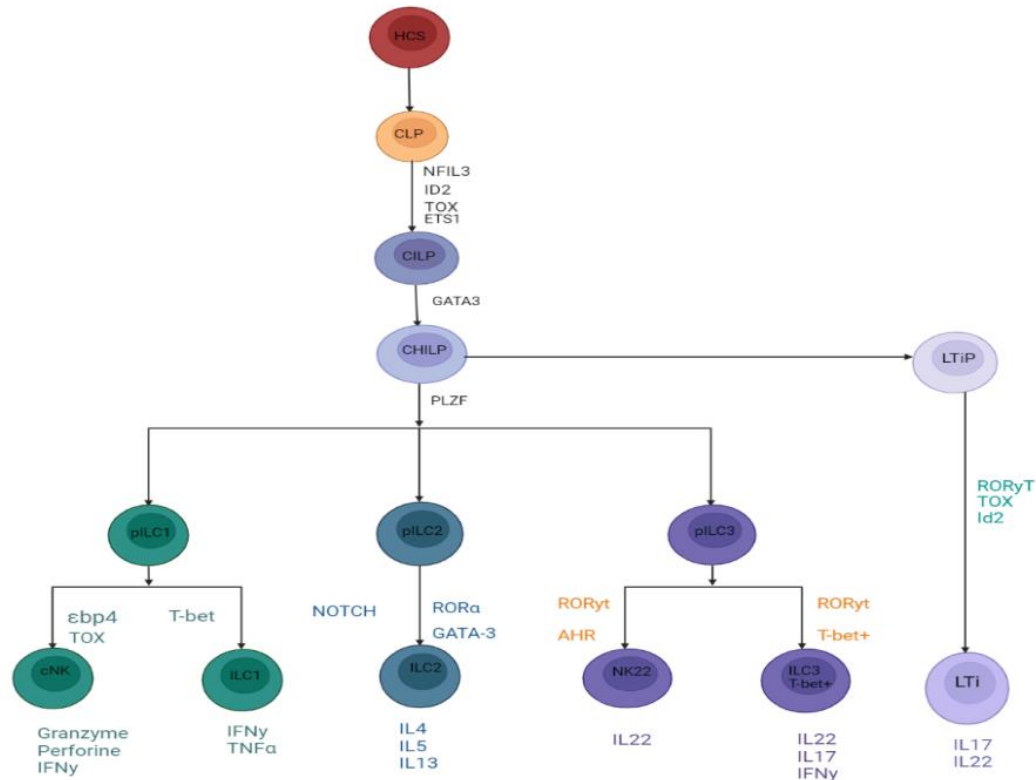


Figure 1.1. Développement des cellules lymphoïdes innées (Cherrier, 2014). Les ILCs se développent à partir des CILP (Common Innate Progéniteur Lymphoïde), qui se différencient eux-mêmes des CLP (Progéniteur Lymphoïde Commun). Les CILP peuvent se différencier en précurseurs de cellules NK (NKP) ou en CHILP (Common Helper Innate Lymphoid Progenitor), qui lui-même donnera LTiP (Progenitor Lymphoid Tissue Inducer) et ILCP (Innate Lymphoid Cell Precursor). Les LTiP se différencient en LTi, et les ILCP en ILC1, ILC2 ou ILC3. Chaque étape de différenciation est dépendante de l'expression des facteurs de transcriptions indiquées: NFIL3 (Nuclear Factor Il-3 Induced); ID2 (Inhibitor Of DNA Binding 2), TOX (Thymocyte selection-associated high mobility group box protein), TCF-1 (T Cell Factor 1), ETS1 (Avian Erythroblastosis Virus E26 Homolog-1), GATA3 (GATA Binding Protein 3), PLZF (Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger), T-bet (T-box transcription factor), Eomes (Eomesodermin), RUNX3 (Runtrelated Transcription Factor 3), ROR α (RAR-related Orphan Receptor α), Bcl11b (B-Cell Lymphoma/Leukemia 11B), GFI1 (Growth Factor Independent 1), ROR γ t (RAR-related orphan receptor γ t), AhR (Aryl Hydrocarbon Receptor).

1.1.3. Sous populations

Tous les ILCs expriment une sous-unité de récepteur de cytokine appelée IL-7 receptor α (CD127). Elles sont divisées en trois groupes, qui sont définis par l'expression des facteurs de transcription et la capacité de production de cytokines (figure 1.2) (Melo-Gonzalez and Hepworth, 2017) (Orimo et al., 2020).

1.1.3.1. ILC de type 1

Les ILCs de type 1 (figure 1.2) constituent un groupe de cellule hétérogène comprenant les cellules NK conventionnelles (cNK) et les ILC1s auxiliaires du type 1 (Th1), ainsi que les ILC1s intra épithéliales (Cella and Robinette, 2021).

1.1.3.1. A. Les cellules cNK

Les cellules Natural killer conventionnelles (cNK) constituent un groupe de cellule hétérogène qui se caractérise par l'expression des molécules CD16, CD56, CD94 et l'absence de CD3 et de récepteur du lymphocyte T (TCR). Ces cellules se localisent dans le foie, les poumons, le placenta, la rate, les ganglions et dans le sang (Erick and Brossay, 2016). Elles se caractérisent également par l'expression des deux facteurs de transcriptions T-bet et Eomes. Les cNK secrètent l'IFN- γ qui est responsable de la lutte contre les infections virales et bactériennes (Fuchs, 2016).

1.1.3.1. B. ILC1s

Les ILC1s répondent principalement à l'inflammation des tissus et aux agents pathogènes intracellulaires, y compris les virus, les bactéries intracellulaires et certains parasites. Ces cellules produisent de l'IFN- γ (Nabekura and Shibuya, 2021).

De plus, il existe le « groupe intra-épithélial » (intra-épithélial ILC1 – ieILC1) qui exprime Eomes (eomesodermin), T-bet, CD103, mais son expression CD127 est négatif. Le développement de ces cellules est indépendant de l'IL-15 (Fuchs et al., 2013a). En réponse à l'IL-12 et à l'IL-15, les ILC1s produisent des cytokines pro-inflammatoires et induisent une activité cytotoxique qui confèrent leur fonction de type NK (Fuchs et al., 2013a).

1.1.3.2. ILC de type 2

Les ILC2s (figure 1.2) sont des cellules qui partagent des similarités avec les cellules Th2. Ces cellules sécrètent de grandes quantités d'IL-5 et 13, qui sont principalement responsables de l'immunité protectrice de l'hôte contre les parasites helminthiques en provoquant de profonds changements dans la physiologie de l'hôte (Herbert et al., 2019). Elles se caractérisent par l'expression des molécules CD90 et IL-7R α et les facteurs de croissance GATA3, ROR α , ID2 et NFIL3 (Herbert et al., 2019).

Les ILC2s sont abondants dans les tissus muqueux, y compris les poumons, l'intestin grêle, le côlon et les ganglions lymphatiques mésentériques (MLN), ainsi que dans la moelle osseuse, la rate, le foie, les reins et les tissus adipocytes (Herbert et al., 2019).

1.1.3.3. ILC de type 3

Les ILC3s (figure 1.2) comprennent 2 sous-populations majeures, les inducteurs de tissu lymphoïde (LTi) caractérisés par l'expression des récepteurs de chimiokines CCR6 (C-C Motif Chemokine Receptor 6) et ILC3s (Montaldo et al., 2015). Ces cellules produisent des cytokines de type Th17 et Th22 telles que l'IL-17 et l'IL-22 en réponse à l'IL-23 et/ou de l'IL-1 β et en présence de ROR γ t et d'hydrocarbures aromatiques. Elles expriment également le récepteur du facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF) et les facteurs de transcription T-bet et ROR γ t et du marqueur de surface CD117 (c-kit) (Zeng et al., 2019).

Les cellules LTi produisent des cytokines qui favorisent l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale et l'immunité protectrice contre les bactéries pathogènes (Sécca et al., 2021). Leur caractéristique distinctive est l'expression de ROR γ t et IL-7R α en absence de marqueurs CD3, CD19, B220, CD11c, Gr-1 (Withers, 2011).

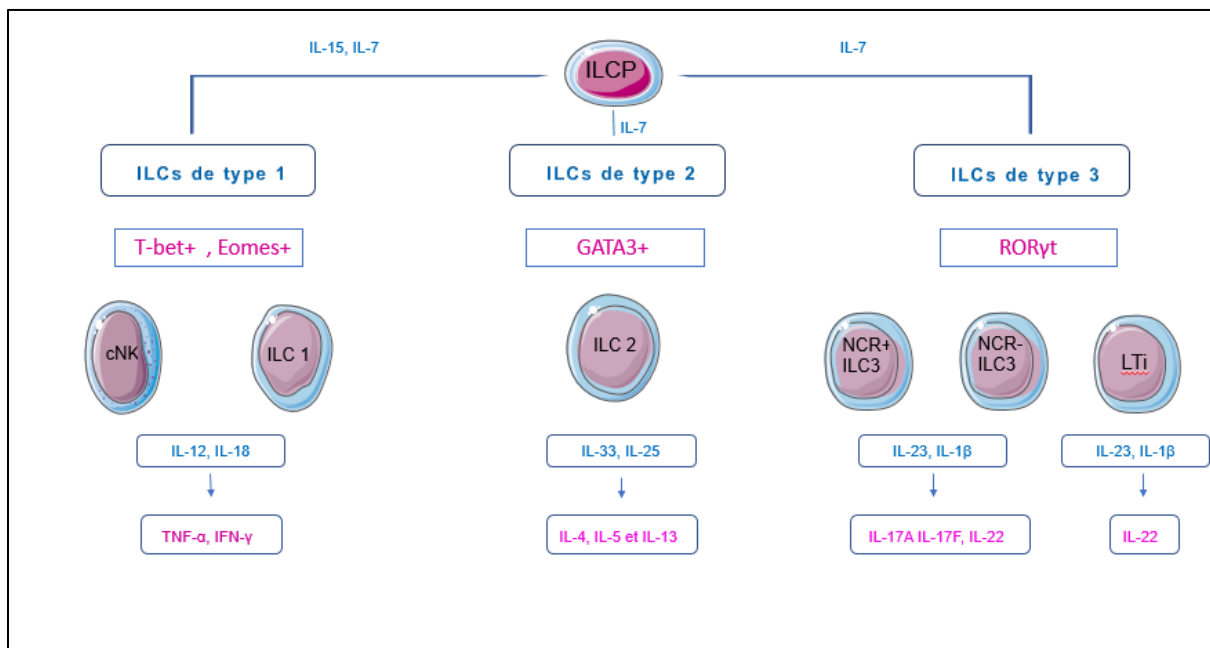


Figure 1.2. Sous-types de cellules lymphoïdes innées (ILCs) (Spits et al., 2013b). cNK, Natural Killer conventionnelles ; GATA3, GATA binding protein 3; IFN- γ , Interféron- gamma; IL, Interleukine; ILC, cellule lymphoïde innée ; ILCP, cellule lymphoïde innée précurseur ; conventionnelles ; LTi, Inducteur de tissu lymphoïde ; ROR γ t, RAR-Related Orphan Receptor gamma T-bet, T-box-expressed-in-T; TNF- α , Tumor Necrosis Factor alpha.

1.1.4. Plasticité

Le concept de plasticité cellulaire a été proposé pour la première fois par Helen Blau en 1985 désignant la capacité des cellules à changer d'identité (Bal et al., 2020). Bien que la classification des ILCs en sous-ensembles d'ILC1, ILC2 et ILC3 fournisse un cadre théorique utile pour comprendre la diversité des ILCs, les programmes fonctionnels de l'ILC peuvent être plus complexes pendant les réponses immunitaires. En fait, plusieurs études conviennent que certaines sous-populations d'ILCs sont fonctionnellement plastiques car elles se convertissent en d'autres sous-populations en présence d'une stimulation appropriée des cytokines (Colonna, 2018) (figure 1.3).

Chez la souris, sous l'influence de l'IL-1 β et de l'IL-12, l'ILC2 peut obtenir des marqueurs caractéristiques des ILC1s, tels que l'expression du facteur de transcription T-bet et la production de l'IFN- γ . Chez l'homme, l'inflammation causée par le virus de la grippe ou la maladie pulmonaire obstructive chronique (BPCO) est associée à la conversion des ILC2s résidents en ILC1s dans les poumons. Cette plasticité d'ILC2s peut être expliquée au moins en partie par l'expansion locale d'ILC1s dans le poumon dans un environnement inflammatoire (Crinier et al., 2017b). De plus, d'autres études ont montré qu'en présence d'IL-1 β , les ILC2s humaines expriment non seulement T-bet, mais également les sous-unités des récepteurs de l'IL-12, IL-12RB1 et IL-12RB2, permettant aux ILC2s de répondre à l'IL-12 (De Salvo et al., 2020).

Le premier indice est venu de l'utilisation de souris rapporteuses ROR γ t^{gfp}, qui est inestimable pour suivre le développement des sous-populations ILC3s. Cela a conduit à la découverte inattendue que certaines cellules du sous-ensemble ILC1s pouvaient exprimer de ROR γ t (indiquée par l'expression de la protéine fluorescente verte (GFP)), même si elles ont perdu ROR γ t et avaient la capacité de produire de l'IFN- γ , la cytokine caractéristique de l'ILC1s, mais pas de l'ILC3s chez la souris, ces ILCs sont décrites comme des cellules « ex-ROR γ T ILC3 » (Almeida and Belz, 2016).

ILC3s utilisent ROR γ t pour produire l'IL-22 et l'IL-17 et se différencient en d'autres sous-populations en fonction de l'expression des récepteurs naturels de cytotoxicité (NCR) (Montaldo et al., 2015). Les ILC3NCR⁻ peuvent se différencier en ILC3NCR⁺ *in vivo* d'une manière dépendante du facteur de transcription T-bet. *In vitro*, ILC3NCR⁻ des souris peuvent se différencier en ILC3NCR⁺ ou bien l'inverse. La voie de signalisation Notch joue un rôle important dans le développement d'ILC3s, induisant la conversion d'ILC3NCR⁻ en ILC3NCR⁺ *in vitro* (Crinier et al., 2017b).

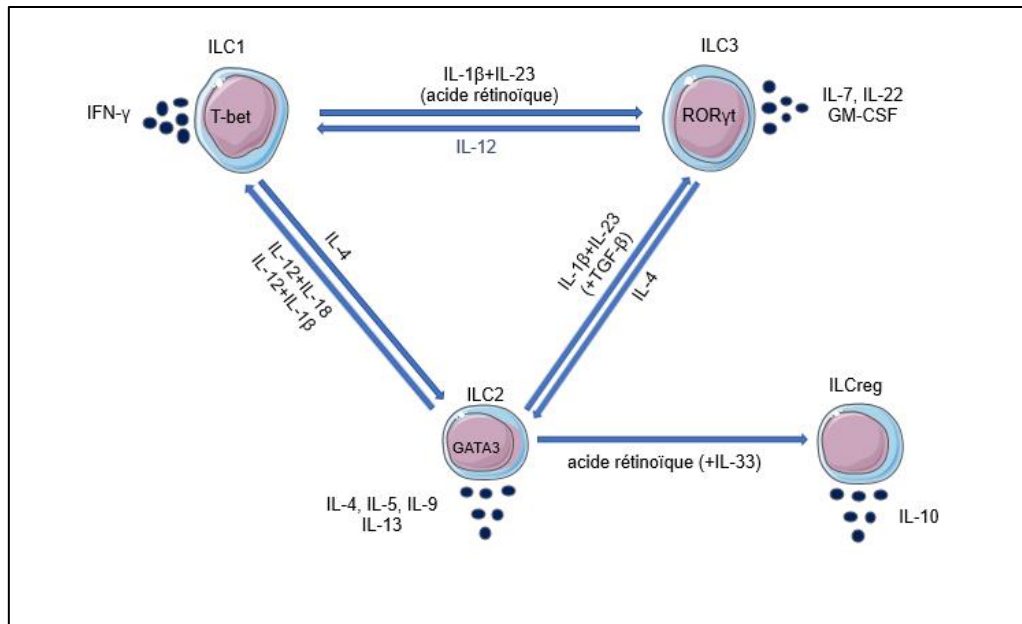


Figure 1.3. Plasticité des ILCs (Orimo et al., 2020). L'IL-4 induit la conversion d'ILC1 et ILC3 en ILC2. L'IL-12, associée à l'IL-1 β ou à l'IL-18, induit la conversion d'ILC2 en ILC1. L'IL-1 β et l'IL-23 ainsi que le TGF- β induisent la conversion d'ILC2 en ILC3. L'IL-1 β et l'IL-23 induisent également la conversion d'ILC1 en ILC3 dans l'intestin, mais cela n'a pas été démontré dans les voies respiratoires. L'acide rétinoïque associé à l'IL-33 induit la conversion de l'ILC2 en ILCreg. GATA3, GATA binding protein 3; IFN- γ , Interféron-gamma; IL, Interleukine; ILC, Cellule Lymphoïde Innée; ROR γ t, RAR-Related Orphan Receptor gamma-t; T-bet, T-box-expressed-in-T; TGF- β , Transforming Growth Factor Beta.

1.1.5. Fonctions des ILCs et cytokines produites

Les ILCs sont des cellules immunitaires dépourvues de récepteur antigénique spécifique, mais capables de produire un éventail de cytokines effectrices dont la variété correspond à celle des sous-ensembles de cellules T helper. Les ILCs jouent un rôle dans la formation des organes lymphoïdes, le remodelage des tissus et l'immunité antimicrobienne, et l'inflammation, en particulier au niveau des surfaces barrières. Leur capacité à répondre rapidement aux agressions causées par des microbes générateurs de stress suggère fortement que les ILCs jouent un rôle essentiel dans les défenses immunitaires de première ligne (Spits and Cupedo, 2012).

ILC1s

ILC1s situées dans l'intestin et activées par l'IL-12, l'IL-15 et l'IL-18 après infection des cellules de l'hôte par des virus ou des bactéries produisent les cytokines effectrices, telles que l'IFN- γ et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α , *tumor necrosis factor alpha*), qui sont à l'origine de l'activation des macrophages et de la production de radicaux oxygénés. Au niveau de l'intestin, les ILC1s produisent d'IFN- γ en réponse à l'IL-12 et suite à une infection intestinale par le parasite *Toxoplasma gondii* (Klose et al., 2014). De plus,

ces cellules participent, avec les lymphocytes T, au contrôle de la réplication du parasite et assurent le recrutement des monocytes inflammatoires (Schulthess et al., 2012).

Il a été observé que les ILC1s CD127 productrices d'IFN γ s'accumulent chez les patients atteints de la maladie de Crohn suggérant que ces cellules pourraient participer à l'aggravation de la pathologie (Fuchs et al., 2013b).

Des travaux antérieurs ont démontré que d'autres cellules NK1.1 + productrices d'IFN- γ sont présentes dans les sites muqueux chez l'homme (Bernink et al., 2013) et chez la souris (Fuchs et al., 2013c).

Chez les souris, Rag1 $-/-$ Tbet $-/-$ comme les souris Rag1 $-/-$ Ifng $-/-$ sont aussi plus sensibles à l'infection par *Clostridium difficile* (*C. difficile*) que les souris uniquement invalidées pour le gène *Rag1*. L'IFN- γ , produit par les ILC1s, participe donc à l'élimination de *C. difficile* en limitant sa dissémination dans le foie et/ou la circulation sanguine (Abt et al., 2015). De plus, sa production par les ILC1s est également nécessaire pour la production du mucus. Enfin, les ILC1s participent à la protection des barrières intestinales contre les infections par les bactéries (Klose et al., 2013).

ILC2s

Les ILC2s assurent leur fonction principalement par la sécrétion des cytokines de type 2, notamment l'IL-5, IL-9 et IL-13 sous l'effet de l'IL-4 (Pelly et al., 2016). Ces cytokines favorisent l'inflammation en agissant sur différents types cellulaires. L'IL-5 participe dans l'activation des cellules myéloïdes innées impliquées dans l'immunité de type 2 et intervient dans le recrutement et l'activation des éosinophiles lors de l'inflammation allergique des voies respiratoires et de l'homéostasie métabolique (Molofsky et al., 2013). De plus, les ILC2s secrètent également l'IL-9 de manière autocrine ou paracrine, entraînant l'expansion des ILC2s, qui expriment également les récepteurs de l'IL-9. Cette expansion dépendante de l'IL-9 s'est avérée essentielle pour la réparation des tissus après la résolution de l'inflammation pulmonaire ou de l'arthrite (Rauber et al., 2017). Enfin, l'IL-13 favorise la différenciation des macrophages en macrophages activés alternativement et stimule la contraction et la prolifération des muscles lisses afin d'éliminer les vers (Klose and Artis, 2016).

Les ILC2s participent à la régulation du développement des « tuft cells », des cellules épithéliales de l'intestin qui détectent les parasites et produisent l'IL-25 (Klose and Artis, 2016). Activées par l'IL-25, l'IL-33 et la cytokine TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin), les ILC2s interviennent dans les réponses antiparasitaires (Cherrier, 2014). Ainsi, au cours de

l'infection par *Nippostrongylus brasiliensis*, ces cellules représentent la source précoce et prédominante d'IL-13. De plus, L'IL-5 et l'IL-13 produites par les ILC2s induisent la vasodilatation, la production de matrice extracellulaire et de mucus et l'activation des macrophages de type2 (MØ2) qui permettent l'élimination des parasites (Klose and Artis, 2016).

ILC3s

Dans les intestins, la majorité des ILCs résidents sont les ILC3s NKp44+ sécrétrices d'IL-22 qui induisent la production de peptides antimicrobiens, de mucus et d'IL-10 (Sanos et al., 2009). L'expression de TLR2 (Récepteur de type Toll 2) confère aux ILC3s humaines la capacité d'interagir directement avec la flore microbienne en plus de leur sensibilité aux cytokines d'origine myéloïdes. Ces cellules font ainsi partie des premiers effecteurs de la réponse immunitaire primaire (Klose and Artis, 2016).

Les ILC3s sécrètent l'IL-17 et l'IL-22 suite à leur activation par l'IL-23 et l'IL-1β produites par les cellules dendritiques lors d'une infection par des microbes extracellulaires. L'IL-17 et l'IL-22 favorisent le recrutement des neutrophiles et la libération de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales (Klose and Artis, 2016). L'IL-22 permet de lutter contre les bactéries symbiotiques qui sont capables d'induire une inflammation systémique à l'origine de pathologies intestinales chroniques (Sonnenberg et al., 2012). De plus, l'IL-22 entraîne également la fucosylation des cellules épithéliales, ce qui les protège de l'infection par *Salmonella typhimurium* (Crinier et al., 2017a). Il a été également montré que cette cytokine est nécessaire à la résistance contre *Citrobacter rodentium* (Sato-Takayama et al., 2008) et participe à l'élimination de *Streptococcus pneumoniae*. En synergie avec l'IFN-α produit par les cellules épithéliales, l'IL-22 protège l'organisme lors d'infections par les rotavirus (Klose and Artis, 2016).

L'IL-22 n'est pas la seule cytokine produite par les ILC3s pouvant avoir un rôle protecteur. Ces cellules sécrètent également des lymphotoxines qui induisent la production d'immunoglobulines A (IgA) par les lymphocytes B de l'intestin (Kruglov et al., 2013).

Enfin, les LTi, qui font partie des ILCs de type 3, sont essentielles à la formation des tissus lymphoïdes au cours de l'embryogenèse (Cherrier, 2014).

1.2. GATA3

1.2.1. Généralités

La protéine GATA binding protein 3 (GATA3) est une protéine appartenant à la famille des facteurs de transcription de type GATA3 (Rao et al., 2020). Le facteur de transcription GATA3 est essentiel à la différenciation des cellules Th2 (Zhu et al., 2004). Ce facteur est également considéré comme un "régulateur principal" de ces cellules. En plus des cellules Th2, il existe d'autres cellules qui expriment cette protéine, notamment les cellules souches hématopoïétiques, les cellules T régulatrices, les cellules TCD8+, les cellules tueuses naturelles thymiques et les précurseurs ILC (Liao et al., 2017).

1.2.2. Membres de famille

Chez les mammifères, la famille des facteurs de transcription GATA se constitue de six membres, de GATA1 à GATA6. Les protéines GATA contiennent deux domaines de transactivation N-terminaux et deux domaines en doigt de zinc caractéristiques de liaison à l'ADN Cys 4, chacune d'entre elles étant suivie d'une région de base conservée. Le doigt de zinc le plus proche de l'extrémité C-terminale assure la liaison à la séquence d'ADN consensus (A/T)-GATA-(A/G), et le doigt de zinc N-terminal stabilise cette liaison et interagit physiquement avec la protéine corégulatrice du doigt de zinc amie de GATA (Friend of GATA3) (Fox et al., 1998).

La plupart des facteurs GATA présentent un schéma d'expression restreint aux tissus et aux cellules. GATA1 et GATA2 sont principalement exprimés dans le système hématopoïétique, tandis que GATA4, GATA5 et GATA6 sont principalement exprimés dans les systèmes cardiaque, pulmonaire et digestif (Bresnick et al., 2012, Chlon and Crispino, 2012). Enfin, les facteurs GATA jouent un rôle central au cours du développement et leur perturbation (à l'exception de GATA5) chez la souris entraîne la létalité embryonnaire (Tindemans et al., 2014).

1.2.3. Localisation et structure du gène *GATA3*

Le gène *GATA3* contient 6 exons situés sur le chromosome 10 (10p14), qui code 444 acides aminés (figure 1.4) (Yang et al., 2020).

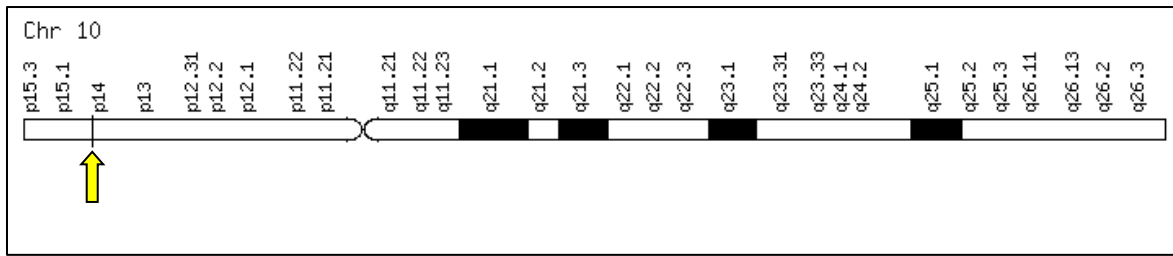


Figure 1.4. Localisation du gène *GATA3* sur le chromosome 10 humain (D'après NCBI, 2011).

Le *GATA3* humain est situé sur le chromosome 10p14 et se compose de six exons (188, 610, 537, 146, 126 et 806 Pb) couvrant 20 kb d'ADN génomique. *GATA3* code pour un facteur de transcription de 444 acides aminés qui contient deux domaines à doigts de zinc (ZnF1 et ZnF2) et deux domaines transactivateurs (TA1 et TA2) (Gaynor et al., 2009). Le doigt de zinc C-terminal est essentiel pour la liaison à l'ADN, tandis que le doigt de zinc N-terminal stabilise cette liaison et interagit physiquement avec d'autres protéines telles que Friends of GATA (FOG). La région C-terminale de *GATA3* est hautement conservée parmi les protéines de la famille GATA (Kurek et al., 2007). Un motif d'acides aminés adjacent au domaine du doigt de zinc C-terminal de *GATA3* (YxKxHxxxRP) est important pour la liaison à l'ADN de *GATA3* et la fonction de *GATA3*, y compris l'activité transcriptionnelle et la capacité à induire un remodelage de la chromatine au niveau des locus de cytokines Th2 conduisant à la différenciation des cellules Th2 (Shinnakasu et al., 2006) (figure 1.5).

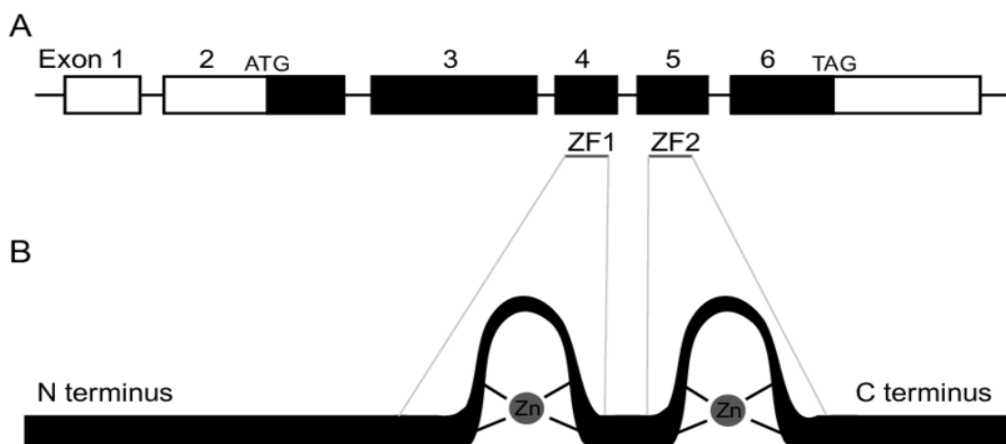


Figure 1.5. Structure du gène *GATA3* (Kurek et al., 2007). (A) La structure génomique du gène *GATA3* comprend six exons. Le site de traduction ATG (Start) est situé dans l'exon 2 et le codon TAG (stop) est situé dans l'exon 6. (B) Structure de domaine de la protéine *GATA3*. Ses deux doigts de zinc (ZF1 et ZF2), son extrémité N-terminale et son extrémité C-terminale sont marquées.

1.2.4. Fonction du GATA3

Le gène *GATA3* contrôle la fonction cellulaire principalement en régulant l'expression des gènes cibles. Par exemple, pour favoriser la différenciation Th2, *GATA3* active l'expression des cytokines Th2 en se liant directement aux promoteurs *Il5* et *Il13*, aux régions intra-géniques de *Il4* et à la région CGRE au sein du locus *Il13* (Yagi et al., 2011). Pour inhiber la différenciation Th1, *GATA3* supprime l'expression d'*IL12Rβ2* (Ouyang et al., 1998) et *STAT4* (Transducteurs de signal et activateurs de transcription) (Usui et al., 2003).

De plus, *GATA3* inhibe l'expression des *Eomes* et la production d'*IFN-γ* en interagissant physiquement avec *Runx3* (Yagi et al., 2010), c'est un régulateur transcriptionnel qui favorise la différenciation Th1 (Djuretic et al., 2007). Pour révéler les cibles de *GATA3* dans les cellules T, une analyse à l'échelle du génome a été réalisée en utilisant une combinaison d'approches ChIP-Seq et RNA-Seq, qui permettent l'identification de séquences d'ADN liées par des complexes protéiques contenant *GATA3* ainsi que le profilage des expression d'ARN (Wei et al., 2011).

De nombreux sites de liaison à *GATA3*, par exemple ceux des *loci* *Ctla4* et *Icos*, sont partagés par différents sous-ensembles de cellules T, y compris les thymocytes, TCD4⁺, TCD8⁺, les cellules Treg, les cellules Th1, Th2, Th17 et NKT. Néanmoins, *GATA3* régule différents programmes de transcription en fonction du contexte cellulaire (Wei et al., 2011). Par exemple, *GATA3* régule directement l'expression des sous-unités Th-POK, *Notch1* et TCR spécifiquement dans les thymocytes et les cellules T naïves, et il contrôle l'expression distincte de 91, 90, 7 et 43 gènes dans Th1, Th2, Th17, et les cellules iTreg respectivement. *GATA3* déploie ainsi des mécanismes partagés et uniques pour contrôler la fonction des différents sous-ensembles de cellules T. Pour atteindre une fonction diversifiée dans différents types de cellules, *GATA3* s'associe à divers cofacteurs, y compris RUNX (Runt-Related Transcription Factor), AP1 (Protéine activatrice 1), TCF11 (Facteur dépendant des cellules T 11), FLI1 (Facteur de transcription de l'intégration de la leucémie amicale 1) d'une manière spécifique au type de cellule, soit pour réguler directement l'expression du gène cible soit pour modifier les marqueurs épigénétiques, tels que la méthylation de l'histone (Wan, 2014a).

Les CLP dérivées de HSC donnent naissance à des cellules lymphoïdes adaptatives et innées. Le développement des ILCs (en haut) reflète le développement des lymphocytes T (en bas). Les étapes du développement ou les fonctions cellulaires qui dépendent absolument de *GATA3* sont marqués. Elles comprennent la génération d'un précurseur ILC commun et la différenciation en cellules NK thymiques et en ILC2s, ainsi que la maturation

des cellules NK. Le *GATA3* réprime le potentiel des cellules B et joue un rôle essentiel dans les différentes étapes du développement des cellules T (figure 1.6) (Tindemans et al., 2014).

Bien que le *GATA3* soit nécessaire à de multiples étapes du développement de la lignée des cellules T, un rôle supplémentaire pour *GATA3* dans les cellules progénitrices lympho-hématopoïétiques pré-thymiques n'est pas encore clair. Les CSH expriment *GATA3* (Ku et al., 2012), bien que les premiers rapports aient révélé que l'absence de *GATA3* n'affectait pas la génération, le maintien ou l'auto-renouvellement des CSH chez les souris fœtales et adultes (Kanhere et al., 2012). En revanche, il a été récemment démontré que la délétion de *Gata3* augmente la croissance des CSH multipotents à long terme HSCs, compatibles avec un rôle de *GATA3* en tant que régulateur autonome de l'équilibre entre l'auto-renouvellement et la différenciation des CSH (Frelin et al., 2013).

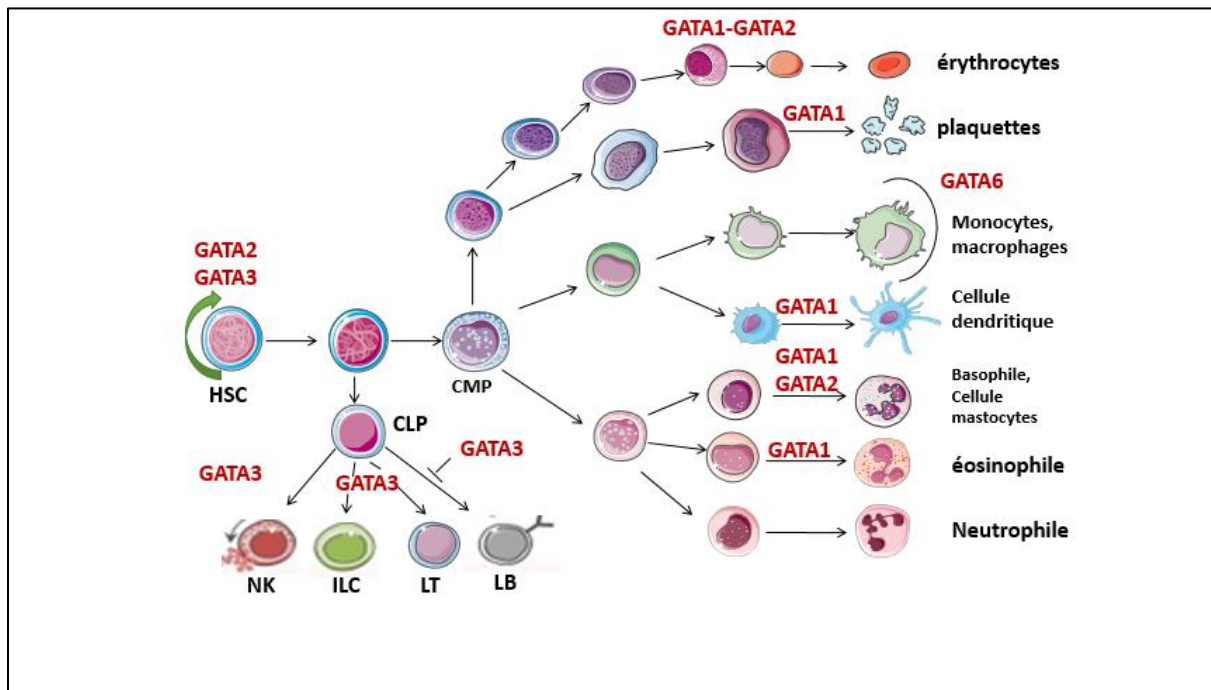


Figure 1.6. Fonctions des facteurs GATA dans le développement hématopoïétique (Tindemans et al., 2014).

Vue d'ensemble de l'hématopoïèse, montrant les principales étapes d'engagement de la lignée des HSC aux cellules sanguines entièrement matures et fonctionnelles. Les facteurs de transcription GATA nécessaires à ces processus sont indiqués en rouge : GATA1 et GATA2 sont importants pour le développement des lignées de cellules érythroïdes et myéloïdes. En revanche, GATA3 n'est impliqué que dans la lignée des cellules lymphoïdes, où GATA3 est crucial pour la maturation des cellules NK, pour le développement des ILC et des cellules T et pour la répression du potentiel des cellules B. CLP, Progéniteur Lymphoïde Commun ; CMP, Ancêtre Myéloïde Commun ; HSC, Cellule Souche Hématopoïétique ; ILC, Cellule Lymphoïde Innée ; NK, Naturel Killer ; GATA, GATA binding protein 3.

1.2.5. GATA3 dans le développement et le fonctionnement des ILCs

Des études récentes ont montré que GATA3 fonctionne comme un régulateur central du développement et du fonctionnement de l'ILCs (Spits et al., 2013a).

1.2.5.1. Fonctions de GATA3 dans les ILC1s

Plusieurs facteurs de transcription sont à l'origine du développement des cellules NK résidentes dans la moelle osseuse et les tissus à partir de précurseurs lymphoïdes, notamment les facteurs T-bet (codés par *Tbx21*) et Eomes, le facteur nucléaire lié à l'interleukine-3 (*Nfil3*), et GATA3 (Vosshenrich and Di Santo, 2013). L'élimination de GATA3 affecte le développement des cellules NK CD11b⁺ matures de la rate et réduit leur capacité à produire de l'IFN γ (Samson et al., 2003). Dans le thymus, une délétion de GATA3 supprime la production de cellules IL7R α + NK (Vosshenrich et al., 2006). Cet effet différent de la suppression de GATA3 sur différents sous-ensembles de cellules NK suggère différentes voies de développement pour les cellules NK traditionnelles et les cellules NK présentes dans les tissus (Daussy et al., 2014).

1.2.5.2. Fonctions de GATA3 dans les ILC2s

Les ILC2s sont enrichis dans l'intestin, les poumons, la peau et les tissus adipeux avec peu d'entre eux trouvés dans les tissus lymphoïdes et dans le sang, et tous les ILC2s expriment des niveaux élevés de GATA3 (Artis and Spits, 2015). Comme les cellules Th2, les ILC2s dépendent de GATA3 pour leur développement. Même après la pleine maturité des ILC2, GATA3 reste important pour leur maintenance et leurs fonctions (Yagi et al., 2014). En fait, GATA3 régule un ensemble commun de gènes importants dans les deux types de cellules, tels que les gènes *Il5*, *Il13*, *Areg*, *Il1rl1* et *Ccr8*, qui sont des gènes bien connus importants pour les réponses immunitaires de type 2 (Yagi et al., 2014).

L'analyse à l'échelle du génome de la liaison de *GATA3* via *ChIP-Seq* montre que *GATA3* se lie au locus du gène *Il4/Il13* sur plusieurs sites dans les cellules Th2 et ILC2 (Wei et al., 2011). *GATA3* se lie également aux promoteurs *Il5* et *Il13* pour induire leur transcription (Tanaka et al., 2011). Bien que la fonction de *GATA3* dans la régulation des modifications épigénétiques au niveau des *loci* des gènes de cytokines dans les ILC2s ne soit pas claire, *GATA3* joue un rôle important dans le remodelage de la chromatine au niveau du locus *Il4/Il13* dans les cellules Th2 (Wei et al., 2011). *GATA3* est nécessaire pour que les ILC2s matures répondent aux cytokines inflammatoires IL-33 et IL-25. Les ILC2s meurent rapidement après la suppression de *GATA3* (Yagi et al., 2014).

Il est possible que les ILC2s déficients en GATA3 ne répondent pas aux cytokines. Alternativement, GATA3 peut réguler directement la prolifération cellulaire et/ou les gènes liés à la survie dans les ILC2s (Yagi et al., 2014).

1.2.5.3. Fonctions de GATA3 dans les ILC3s

Les ILC3 sont une population hétérogène et comprennent des cellules inductrices de tissu lymphoïde (LTI) CCR6+ nécessaires à l'organogenèse du tissu lymphoïde dans les ganglions lymphatiques et les plaques de Peyer pendant la vie fœtale et à la formation postnatale d'amas lymphoïdes intestinaux (van de Pavert et al., 2014). De plus, les ILC3 CD4+ adultes qui peuvent être trouvés dans les tissus lymphoïdes secondaires et dans les sites muqueux et produisent de l'IL-17A et de l'IL-22 qui peuvent contribuer à la défense immunitaire (Takatori et al., 2009).

Récemment, GATA3 s'est avéré important pour le développement des cellules LTI et ILC3s Tbet+ (Serafini et al., 2014). ILC3 exprime une protéine GATA3 abondante, bien qu'à des niveaux inférieurs à ILC2 mature. Les souris chimériques hématopoïétiques dérivées d'hépatocytes fœtaux déficients en GATA3 étaient incapables de générer des sous-ensembles ILC3s de l'intestin, indiquant un défaut dans la production d'IL-22 et le maintien de l'homéostasie de la barrière muqueuse après l'infection (Serafini et al., 2014).

Chez le fœtus, GATA3 est essentiel pour la différenciation des cellules de type CD135+ α 4 β 7 + CLP et son expression intrinsèque est essentielle pour générer des cellules précurseurs ROR γ thIL-7R α hi du foie fœtal (Serafini et al., 2014). Bien que les voies transcriptionnelles dépendantes de GATA3 qui régissent le développement d'ILC3s restent floues, les analyses d'ARN-seq ont révélé que l'ablation de GATA3 ne modifie pas l'expression de Rorc, Runx1, Runx3, AhR, ID2 ou Tcf7 dans les ILC3s matures (Yagi et al., 2014). Ce résultat reflète probablement le rôle dépendant du contexte de GATA3 dans le développement précoce de l'ILCs qui n'est pas récapitulé dans les ILC3 matures, car des rapports précédents démontrent que l'expression de GATA3 dans l'ILC3s mature ID2+ n'est pas essentielle pour leur homéostasie (Hoyler et al., 2012, Wan, 2014b).

1.3. Infections parasitaires

1.3.1. Généralités

Les infections parasitaires sont causées par trois types d'organismes: les protozoaires, les helminthes et les ectoparasites (Cummings and van Die, 2015).

1.3.1.1. Protozoaires

Un protozoaire est un organisme unicellulaire eucaryote. Du point de vue étymologique, le terme protozoaire signifie « premiers animaux ». Les protozoaires ont la particularité d'avoir dans leur cycle de vie une phase de dissémination dans l'environnement. Ces dernières, parfois modifiées par les besoins de l'homme, assureront la dispersion, voire la concentration des stades infectieux parasitaires et de ce fait conduiront aux infestations et aux épidémies.

Ce sont des parasites responsables de zoonoses et des maladies opportunistes chez les sujets immunodéprimés. Face à leur augmentation, des efforts importants ont été réalisés, accompagnés de nombreuses avancées dans leur diagnostic (Mougeot, 2001).

1.3.1.2. Helminthes

Les helminthes sont les plus grands organismes à infecter les hôtes vertébrés, conduisant à la libération de grandes quantités de molécules parasitaires qui interagissent avec le système immunitaire. On s'attend à ce que l'infection par les helminthes déclenche une forte réponse immunitaire qui élimine le parasite tout en provoquant une inflammation potentiellement dommageable.

Cependant, la coévolution de l'hôte et du parasite sur des milliers d'années a permis à l'hôte et au parasite de survivre en développant des mécanismes qui atténuent la réponse inflammatoire de l'hôte au parasite ou même permettent au parasite d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte, entraînant des infections souvent asymptomatiques (Maizels and McSorley, 2016). Par exemple, les adultes de l'espèce *Schistosoma*, qui vivent dans le système vasculaire humain, peuvent survivre pendant de nombreuses années sans induire de fortes réponses inflammatoires de l'hôte (Cruz et al., 2017).

1.3.1.3. Ectoparasites

Les ectoparasites sont des organismes pluricellulaires qui ont besoin d'un hôte vivant pour survivre. Ces organismes provoquent des morsures ou s'enfoncent dans la peau de leur hôte. La réactivité immunitaire stimulée par les ectoparasites et autres arthropodes a fait l'objet d'une attention soutenue ces dernières années. Il est clair que le large éventail de réponses de l'hôte est déclenché, et les mécanismes effecteurs immunitaires semblent être actifs pour limiter l'infestation par les arthropodes hématophages. La réponse immunitaire de l'hôte semble être modifiée à la suite d'une infestation par certains arthropodes, et l'impact de ces altérations sur la transmission des agents pathogènes à transmission vectorielle reste à déterminer (Wikel, 1984).

La modulation de la réponse immunitaire de l'hôte par les parasites a été signalée pour un certain nombre d'infections. L'altération de la fonction immunologique de l'hôte peut se produire de différentes manières, notamment en interférant avec les mécanismes de défense de l'hôte (Rickard and Williams, 1982).

1.3.2. Rôle des ILCs dans les infections parasitaires

Les ILCs ont fait une entrée fracassante sur la scène immunologique grâce à leur implication dans les infections bactériennes et helminthiques. Au fur et à mesure de leur influence, il est devenu clair qu'elles jouent un rôle fondamental dans la régulation de l'homéostasie des tissus de la barrière et de la réponse immunitaire pendant l'inflammation. Un sous-ensemble d'ILCs, les ILC2s, est devenu le centre d'intérêt de nombreux biologistes spécialistes des helminthes. Se plaçant sous les feux de la rampe en tant qu'initiateur et amplificateur insaisissable de la réponse de type 2. Dans cette revue, nous avons réexaminé la génération et la fonction des ILC de type 2 dans l'infection par les helminthes et la mesure dans laquelle leurs rôles peuvent être essentiels ou redondants (Löser et al., 2019).

1.3.2.1. Rôle des ILC1s

Il a été montré que les cellules NK intestinales des souris génétiquement déficientes en T-bet sont impliquées dans les réponses contre les infections à *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) par la production de l'IFN- γ qui inhibe la réplication du parasite (figure 1.7). Fait intéressant, l'IL-12 a été identifiée comme une cytokine qui contrôle la production d'IFN- γ par les lymphocytes NK1.1⁺ CD3 ϵ ⁻. Étonnamment, les cellules NK intestinales conventionnelles ne produisent pas d'IFN- γ ou de TNF en réponse à l'IL-12 tandis qu'ILC1s produit des niveaux élevés d'IFN- γ . De plus, les cellules NKp46⁺ sont impliquées dans le recrutement des monocytes inflammatoires (Schulthess et al., 2012) au cours de l'infection à *T. gondii* (Dunay et al., 2008).

De plus, L'IFN γ pathogène favorise la polarisation des macrophages M1. Les macrophages M1 fabriquent plus d'IL-12, ce qui entraîne une activation excessive des cellules T CD4+ pouvant provoquer des lésions tissulaires. Aussi, l'infection par *T. gondii* incite les cellules stromales à produire de l'IL-33, qui, en synergie avec l'IL-12, amplifie la production d'IFN- γ par les ILC pour les protéger (Clark et al., 2021). Ces données suggèrent que l'IL-12, l'IL-33 et l'IFN γ sont les médiateurs de la diapasonie entre les ILC1s, les cellules stromales et les DC pour protéger contre l'infection par *T. gondii*.

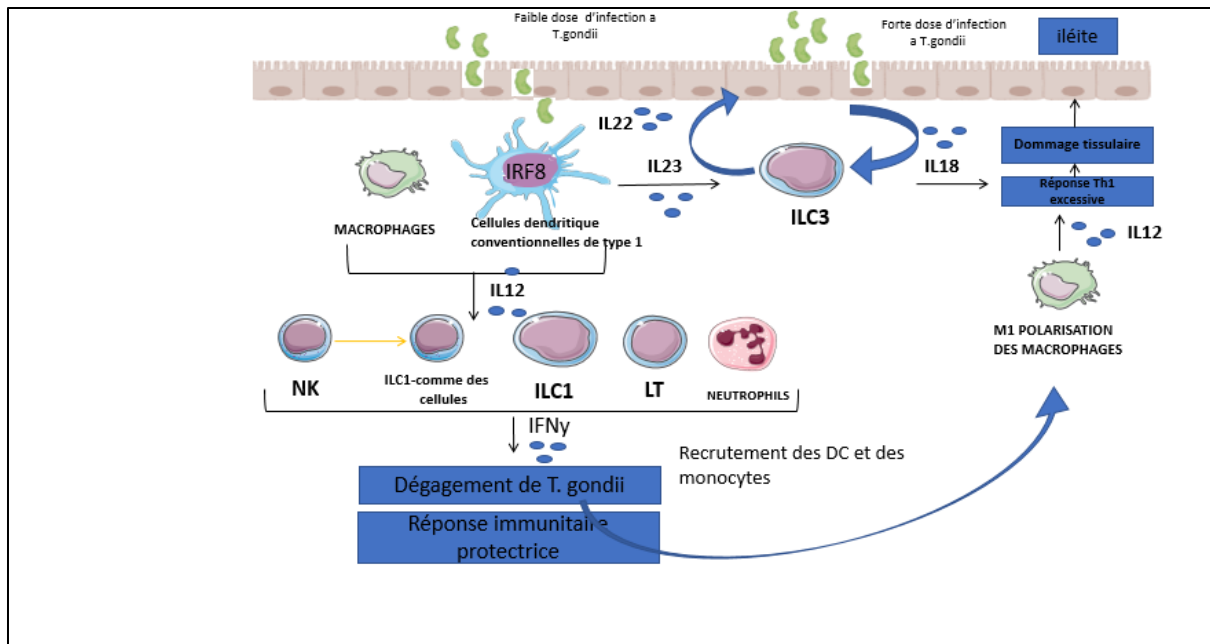


Figure 1.7. Rôle des ILC1s dans le contrôle de l'infection à *Toxoplasma gondii* (Korchagina et al., 2021). Le contrôle du parasite est associé à une réponse immunitaire de type 1. Lors de l'infection, le parasite infecte les entérocytes de l'iléon. En réponse à l'invasion de *T. gondii*, les cellules épithéliales libèrent des cytokines (IL-8, CCL5 et CCL3), qui activent les cellules présentatrices d'antigène (les cellules dendritiques (DC) et les macrophages (MΦ)). De plus, La reconnaissance des parasites par les DC conduit à la production d'IL-12, qui stimule la sécrétion d'IFN γ par les cellules NK, les ILC et les cellules T. La production d'IFN γ conduit à l'élimination des parasites. De plus, L'infection à *T. gondii* entraîne la plasticité des cellules NK en cellules de type ILC1 en régulant à la baisse l'expression d'Eomes. En revanche, l'IFN γ pathogène favorise la polarisation des macrophages M1 en produisant plus d'IL-12, ce qui entraîne une activation excessive des lymphocytes T CD4+ pouvant entraîner des lésions tissulaires. De plus, pendant l'infection par *T. gondii*, les cellules épithéliales intestinales produisent de l'IL-18 qui renforce l'induction de l'IFN γ . De plus, l'IL-23 dérivée des DC entre en synergie avec l'IL-18 pour induire la production d'IL-22 par les ILC3. L'IL-22 pilotée par ILC3 améliore la production d'IL-18 par les cellules épithéliales, résultant en une amplification de la boucle de rétroaction positive pathogène qui exacerbe la réponse immunitaire induite par Th1.

1.1.7.2. Rôle des ILC2s

Étant donné que le cycle de vie des helminthes, tels que *N. brasiliensis*, crée des lésions tissulaires, par exemple la rupture des capillaires dans les poumons, les réponses immunitaires de type 2 se sont non seulement développées pour combattre l'infection par les helminthes, mais également pour favoriser la réparation et le remodelage des tissus par la sécrétion de molécules, comme AREG (Turner et al., 2013).

Comme toutes les autres réponses immunitaires, la fonction des ILC2s nécessite une contre-régulation permettant le contrôle de leur fonction. Les interférons de type 1 et de type 2 peuvent réguler négativement les ILC2s (Duerr et al., 2016, Molofsky et al., 2015) ,et les deux types d'interférons sont connus depuis longtemps pour inhiber les réponses TH2 causées par les helminthes. En outre, les ILC2s peuvent être supprimées par l'IL-27(Moro et al., 2016) et expriment le récepteur inhibiteur KLRG1 (killer cell lectin-like receptor G1).

Dans les ILC2s humaines, le ligand de la protéine KLRG1, l'E-cadhérine, a inhibé l'expression de GATA3 et la production de cytokines TH2 (Salimi et al., 2013). GATA3, le facteur de transcription essentiel à la polarisation et à la fonction des cellules T CD4+ TH2, est essentiel pour la différenciation, le maintien et l'activation des ILC2s (Hoyler et al., 2012, Mjösberg et al., 2012) . Il est également utilisé comme marqueur d'identification pour les distinguer des autres sous-ensembles d'ILCs. En outre, le développement, la différenciation et la fonction des ILC2s dépendent de ROR α (Wong et al., 2012, Halim et al., 2012), T-cell factor-1 (TCF-1) (Mielke et al., 2013) et GFI1 (Spooner et al., 2013).

Le rôle de l'ILC2s dans la défense contre l'infection par les helminthes est multiforme et médié par la production des cytokines de type 2 et aussi par des interactions directes avec les lymphocytes T (figure 1.8). Au cours de l'infection par *N. brasiliensis* (*Nippostrongylus brasiliensis*)https://fr.wikipedia.org/wiki/Nippostrongylus_brasiliensis, les ILC2s exprimant CMHII interagissent avec les cellules T spécifiques de l'antigène qui produisent à leur tour de l'IL-2 pour encourager la prolifération d'ILC2s et la production de cytokines de type 2. La suppression d'ILC2s CMHII atténue la capacité d'ILC2s à stimuler l'expulsion de *N. brasiliensis*, soulignant l'importance de la diaphonie ILC2-T-cel. De plus, L'IL-5 et d'IL-13 produites par ILC2s contribuent aux principales fonctions antihelminthiques, y compris l'éosinophilie (Nussbaum et al., 2013) et hyperplasie des cellules caliciformes (Neill et al., 2010). De plus, l'activation des cellules B et le passage à une classe d'isotype d'IgE, la polarisation des macrophages activés alternatifs et le début d'une réaction adaptative Th2 incluant la génération de lymphocytes Th2 à mémoire CD4+ sont remarqués (figure 1.8).

Il est à noter que les ILC2s dépendent de l'IL-25 pour leur survie et leur activation (Neill and Flynn, 2018). La suppression de cette cytokine ou de son récepteur IL-25R (IL-17E-R) entraîne l'absence de ces cellules et donc la perte de la réponse protectrice contre l'infection par *N. brasiliensis*.

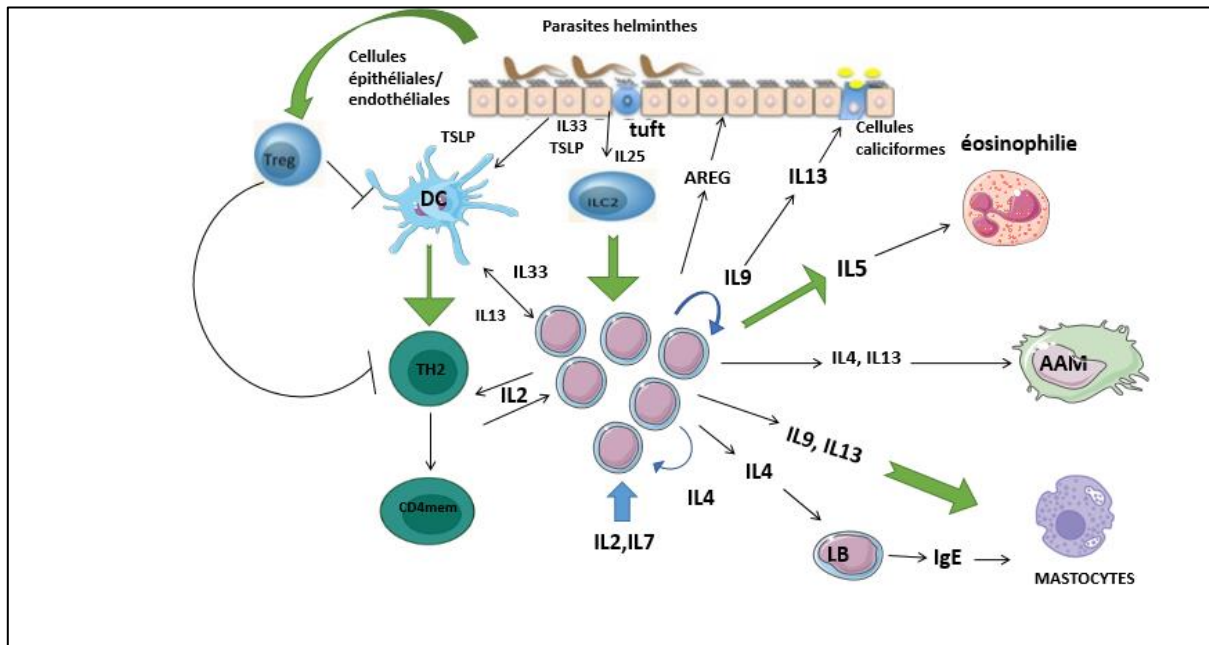


Figure 1.8. Réponses immunitaires induites par les helminthes et médiées par les ILC2s (Nausch and Mutapi, 2018). Les parasites helminthes déclenchent la sécrétion d'alarmines par les cellules épithéliales (IL-33, TSLP) ou par les cellules de la touffe (IL-25) comme les cellules dendritiques ou les macrophages pour activer les ILC2. L'activation des ILC2 est maintenue et multipliée par l'IL-4 et l'IL-9 (agissant de manière autocrine) et nécessitent l'IL-2 et l'IL-7 pour l'homéostasie et l'activation. Les ILC2 sécrètent des cytokines lors de leur activation. L'IL-5 induit l'éosinophilie, et l'IL-4 déclenche les cellules B et induit une commutation isotypique vers les IgE. En outre, l'IL-13 peut activer la sécrétion de mucus par les cellules des gobelets, agissent sur les mastocytes (potentiellement dans conjointement avec l'IL-9). L'IL-4 et l'IL-13 peuvent également induire des macrophages activés alternatifs (AAM). Les ILC2 sécrètent aussi de l'amphiréguline (Areg), importante pour la réparation des tissus. En outre, les ILC2 interagissent avec les cellules T CD4+ TH2, ce qui induit une réponse immunitaire TH2 et l'IL-2 sécrétée par les cellules T pourrait soutenir davantage les réponses des ILC2 et affecter la génération de la mémoire des cellules T, qui est altérée dans les infections chroniques par helminthes.

1.4. PCR

1.4.1. Définition

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR, polymérase chain reaction) a été inventée par Mullis en 1983 et brevetée en 1985. Il s'agit d'une technique rapide, peu coûteuse et simple. Elle est devenue un outil essentiel et indispensable dans la recherche médicale et biologique (Jakhesara et al., 2012). Sa puissance est devenue évidente dans plusieurs domaines et applications: comme dans le diagnostic des maladies infectieuses, la détection des variations et mutations des gènes (Powledge, 2004) , et elle joue aussi un rôle essentiel dans l'étude de l'expression du gène.

1.4.2. Principe de la PCR

La PCR est une technique qui permet d'obtenir de grandes quantités d'une séquence d'ADN spécifique à partir d'un échantillon d'ADN (Acide désoxyribonucléique). Son principe de la PCR est basé sur l'utilisation de l'ADN polymérase qui est un agent de réplication de séquences d'ADN spécifiques. Cette méthode peut générer des dizaines de milliards de copies d'un fragment d'ADN particulier (séquence d'intérêt, ADN d'intérêt ou ADN cible) à partir d'un extrait d'ADN (matrice d'ADN) (Kadri, 2020). L'ADN matriciel peut être de l'ADN génomique ainsi que complémentaire obtenu par RT-PCR à partir d'un extrait d'ARN messager (poly-A RNA), ou encore de l'ADN mitochondrial.

La PCR comprend trois phases essentielles : une phase de dénaturation, une phase d'hybridation avec les amorces, et une phase d'élongation. Les produits de chaque étape de synthèse servent de modèle pour les étapes suivantes, ce qui permet une amplification exponentielle (Kadri, 2020).

1.4.3. Les composants de la PCR

1.4.3.1. L'ADN

Avant la réaction de PCR, l'ADN est extrait à partir de l'échantillon que l'on veut analyser (salive, cheveux, cellules, fossile...). Puis, cet extrait purifié en ADN, contenant le fragment d'ADN que l'on souhaite amplifier (Ghannam and Varacallo, 2022).

1.4.3.2. Les amorces

Les amorces sont une courte paire d'oligonucléotides, simple brin, sens et anti-sens (Ishmael and Stellato, 2008) d'environ 20 bases (Seemayer, 1990). Elles sont spécifiques et complémentaires aux extrémités de la séquence d'ADN cible d'intérêt et agissent comme un point de départ pour la synthèse du nouveau brin d'ADN (Shah, 2019). Ces amorces sont

Chapitre 1. Revue de la littérature

nécessaires à la synthèse de molécule et sont conçues pour s'hybrider à des brins parallèles ou antiparallèles d'une molécule d'ADN cible. Les données de séquence des extrémités de l'ADN sont nécessaires pour la conception des amorces(Elkins, 2015,2008).

Lors de la conception des amorces, plusieurs caractéristiques doivent être prises en considération :

- La longueur des amorces doit être comprise entre de 15 à 30 résidus nucléotidiques (bases).
- La teneur optimale en GC doit se situer entre 40 et 60 %.
- L'extrémité 3' de l'amorce doit contenir un G ou un C pour resserrer l'amorce et empêcher la "respiration" de l'extrémité, augmentant ainsi l'efficacité de l'amorce. La "respiration" de l'ADN se produit lorsque les extrémités ne restent pas recuites, mais se bagarrent ou se fendent. Trois liaisons hydrogène dans la paire GC aide à empêcher la respiration, mais augmentent également la température de fusion des amorces.
- Les extrémités 3' des ensembles d'amorces (y compris l'amorce du brin plus et l'amorce du brin moins) ne peuvent pas être complémentaires l'une de l'autre, et les extrémités 3' d'une seule amorce ne peuvent pas être complémentaires d'autres séquences de l'amorce. Ces deux conditions conduisent à la formation de dimères d'amorces et de structures en épingle à cheveux, respectivement.
- La température de fusion optimale (T_m) pour les amorces se situe entre 52 et 58 °C, mais la plage peut être étendue à 45-65 °C. La T_m finale des deux amorces ne doit pas différer de plus de 5 °C.
- Les répétitions de dinucléotides (par exemple GCGCGCGCGC ou ATATATATAT), les séquences à base unique (par exemple AAAA ou CCCCC) doivent être évitées car elles peuvent entraîner le glissement de boucles en épingle à cheveux le long du fragment d'amorce. ADN et/ou formation. N'incluez que des répétitions ou des travaux à base unique jusqu'à 4 bases si cela est inévitable en raison de la nature de la matrice d'ADN(Lorenz, 2012).

Il existe un certain nombre de programmes informatiques conçus pour faciliter la conception de paires d'amorces. NCBI Primer Design Tool <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/> et Primer 3 <http://frodo.wi.mit.edu/primer3> sont des sites recommandés pour cela.

1.4.3.3. Les nucléotides

Les désoxy-nucléotides triphosphates (dNTP) sont les éléments constitutifs de l'ADN qui comportent quatre nucléotides libres, dGTP, dATP, dTTP, dCTP et servent une mémoire pour Taq polymérase pour synthétisé le nouveau brin (Kadri, 2020).

1.4.3.4. L'enzyme, Taq polymérase

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 (Jalali et al., 2017).

L'ADN polymérase isolée d'*Escherichia coli* était inactivée de manière irréversible en présence de température élevée pour la dénaturation de l'ADN, ce qui oblige à ajouter une nouvelle enzyme fraîche à chaque cycle de la réaction et cela rend le processus coûteux et très long (Seemayer, 1990). Cependant, ce processus a été nettement amélioré en substituant l'enzyme par une autre polymérase thermostable qui était la Taq polymérase isolée à partir de la bactérie *Thermus aquaticus*, une bactérie qui se développe dans les sources chaudes (Mullis, 1990). Cette polymérase est stable à des températures élevées ce qui a permis l'automatisation de la réaction (Powledge, 2004). A ce jour, un large choix d'enzymes thermostables est disponible mais la Taq polymérase reste la plus couramment utilisée (Bhat and Rao, 2020).

1.4.3.5. Ions de Mg²⁺

Les ions Mg²⁺ libres sont nécessaires en tant que cofacteur pour l'activité de l'ADN polymérase. Toutefois, ces ions forment des complexes avec les dNTP, les amorces et les matrices d'ADN (Seemayer, 1990).

1.4.3.6. Le thermocycleur

Un thermocycleur est un appareil thermique qui change rapidement la température selon les réglages où l'ensemble de la réaction se déroule (Shah, 2019).

1.4.4. Etapes de la PCR

Il y'a trois étapes principales dans le processus de l'amplification par PCR : la dénaturation, l'hybridation et l'élongation (figure 1.9).

1.4.4.1. La dénaturation

C'est la séparation des deux brins d'ADN, obtenue en élevant la température. La première période est réalisée à une température de 94°C, appelée température de dénaturation. A cette température, l'ADN matriciel utilisé comme matrice lors de la réplication est dénaturé, les liaisons hydrogène ne peuvent pas être maintenues à des températures supérieures à 80 °C et l'ADN double brin est dénaturé en ADN simple brin (simple brin ADN) (Ahrberg et al., 2016).

1.4.4.2. L'hybridation

La deuxième étape est l'hybridation. Elle est réalisée à une température habituellement comprise entre 40 et 70°C, appelée température d'hybridation des amorces. La baisse de température permet de reformer les liaisons hydrogène pour que les brins complémentaires puissent s'hybrider. Les amorces s'hybrident plus facilement que l'ADN matrice à long brin. Plus la température d'hybridation est élevée, plus l'hybridation est sélective et plus la spécificité est élevée (Kadri, 2020).

1.4.4.3. L'élongation

La troisième phase est réalisée à une température de 72°C, appelée température d'élongation. C'est la synthèse du brin complémentaire. À 72°C, La Taq polymérase se lie à l'ADN simple brin amorcés et utilise le désoxyribonucléoside triphosphate présent dans le mélange réactionnel pour catalyser la réplication (Ahrberg et al., 2016). Les trois étapes forment un cycle. La PCR se fait entre 30 et 40 cycles.

Le produit résultant de chaque cycle appelé «l'amplicon» (Overbergh et al., 2017) devient le modèle d'ADN du suivant, d'où la réaction en chaîne (Welch, 2012). A la fin de chaque cycle, la quantité de l'ADN cible sera amplifiée de façon exponentielle environ 2^n , où n représente le nombre de cycles (Waters and Shapter, 2014).

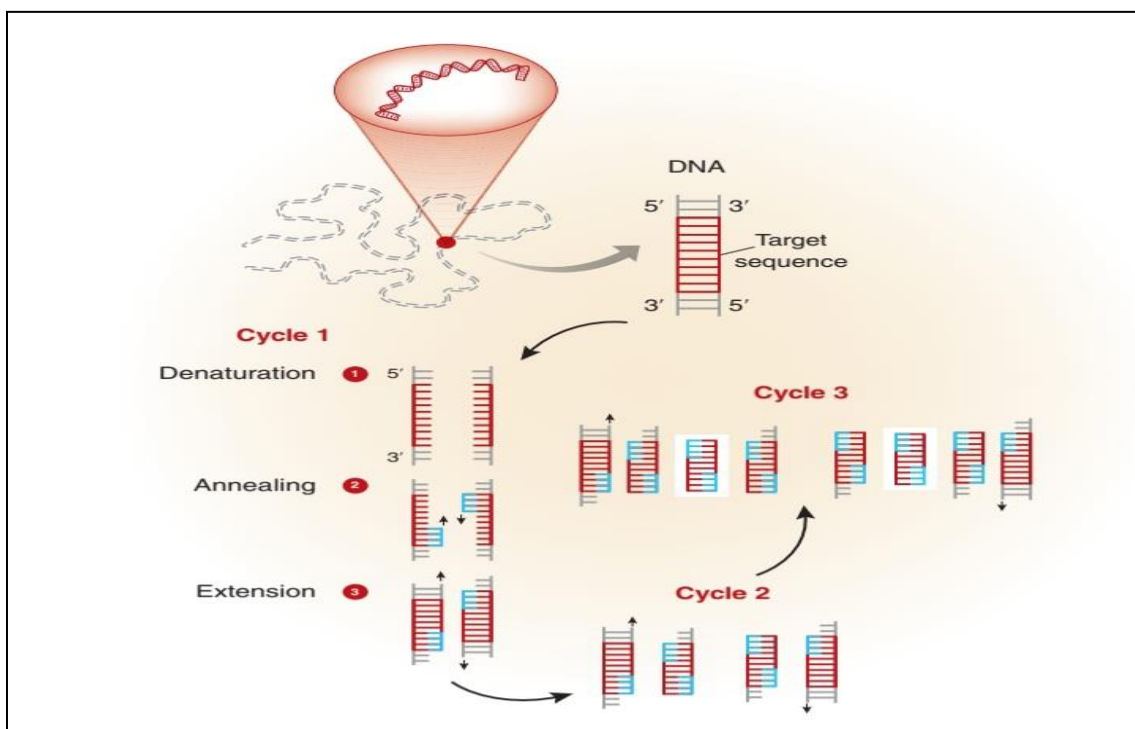


Figure 1.9. Présentation schématique du principe de la PCR (Garibyan and Avashia, 2013).

1.5. Problématique et objectif

1.5.1. Problématique

Les ILCs du groupe 2 (ILC2s), décrites à l'origine comme des "nuocytes" et des "cellules innées 2", sont considérées comme les homologues innés des cellules Th2 et nécessitent l'expression de GATA3 pour la production de cytokines de type 2 ; IL-5 et IL-13. Ces cellules jouent un rôle crucial dans les réponses immunitaires aux infections parasitaires extracellulaires telles que les helminthes. De plus, il a été montré que GATA3 est le principal facteur de transcription qui contrôle la différenciation, la maintenance et le fonctionnement des ILC2s. L'analyse de l'expression génique à l'échelle du génome a révélé que ce facteur régule un ensemble similaire de cytokines et de récepteurs dans ILC2s et un déséquilibre dans l'expression de ce gène peut affecter le fonctionnement des ILCs.

Dans ce travail, nous allons nous intéresser sur le gène *GATA3* dont l'étude de son rôle nécessite l'utilisation de plusieurs techniques de biologie moléculaire, comme la PCR. Pour la réussite de cette dernière on a élaboré des amorces à l'aide de l'outil Primer-BLAST.

1.5.2. Objectif

L'objectif de ce travail consiste à l'élaboration des séquences d'oligonucléotides qui serviront d'amorces d'amplifier l'exon 1 du gène *GATA3* par PCR.

1.5.3. But

Ce travail consiste à concevoir des amorces spécifiques à l'exon 1 du gène *GATA3* afin d'analyser des polymorphismes.

Chapitre2.Matériel et méthodes

2.1. Conception des amorces

La conception des amorces de la région spécifique est une étape préliminaire pour l'amplification de l'ADN. Une amorce doit être complémentaire au brin d'ADN et orientée dans le bon sens 5'→3' (Ahrberg et al., 2016).

La conception de l'amorce est sans doute le paramètre le plus important si la PCR réussit, des amorces mal conçues empêchent la réaction de se dérouler réaction en chaîne par polymérase. La séquence d'amorce détermine plusieurs paramètres tels que la position et Longueur du produit, température de fusion et rendement final (Elkins, 2015).

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

- **La longueur de l'amorce**

La longueur optimale des amorces PCR est de 18 à 22 nucléotides. Cette longueur est suffisamment longue pour garantir une spécificité adéquate et suffisamment courte pour permettre aux amorces de se lier facilement à la cible à la température d'hybridation (Durbin, 1975).

- **Température de fusion (T_m)**

La température de fusion de l'apprêt (T_m) doit être comprise entre 55 et 80 degrés Celsius, suffisamment basse pour permettre une fusion complète à ou supérieure à 90 degrés Celsius, mais suffisamment élevée pour permettre le recuit (Lorenz, 2012).

- **La teneur en GC**

Comme nous l'avons vu précédemment, les paires de bases G-C sont plus fortes que les paires de bases A-T, ce qui signifie qu'une teneur plus élevée en GC fournit une liaison plus stable entre l'amorce et l'ADN matrice. La teneur optimale en GC d'une amorce se situe entre 40 et 60 %, et les amorces doivent comporter deux ou trois G et C à l'extrémité 3' pour se lier plus spécifiquement à l'ADN matrice (Lorenz, 2012).

- **La spécificité**

La spécificité de l'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.

Une expérience de PCR peut échouer si les amorces ne sont pas liées à des régions spécifiques ou si elles réapparaissent dans l'échantillon. Sont pas fixées à des régions spécifiques ou si elles réapparaissent dans la séquence de l'ADN (Chuang et al., 2013).

Les amorces doivent être choisies de telle sorte qu'elles aient une séquence unique dans l'ADN matrice qui doit être amplifié, une température de fusion de 55–72 °C donne les meilleurs résultats.

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

Un autre risque connexe est l'homologie inter-amorce. L'homologie partielle dans les régions centrales de deux amorces peut interférer avec l'hybridation. Si l'homologie se situe à l'extrémité 3' de l'une ou de l'autre amorce, la formation de dimères d'amorce se produira, ce qui, par compétition, empêchera le plus souvent la formation du produit désiré (Lorenz, 2012).

- **Séquence à l'extrémité 3'**

Il est établi que la position terminale 3' dans les amorces PCR est essentielle pour empêcher le désamorçage, Le problème des homologies d'amorce se produisant dans ces régions a déjà été reporté (Ferrara et al., 2018).

Il est à noter que le nombre de bases de l'amorce spécifique choisie doit être inférieur à 1000, et le nombre des produits aspécifiques doit être supérieur à 1000.

2.2. Conception des amorces pour amplifier le gène *GATA3*

2.2.1. Détermination de la séquence du gène *GATA3*

La conception des amorces encadrant le gène *GATA3* commence par trouver séquence de référence du gène *GATA3*. La base de données « Ensembl » « www.ensembl.org » est utilisée pour connaître la séquence du gène *GATA3* (figure 2.1).

Chapitre2.Matériel et méthodes

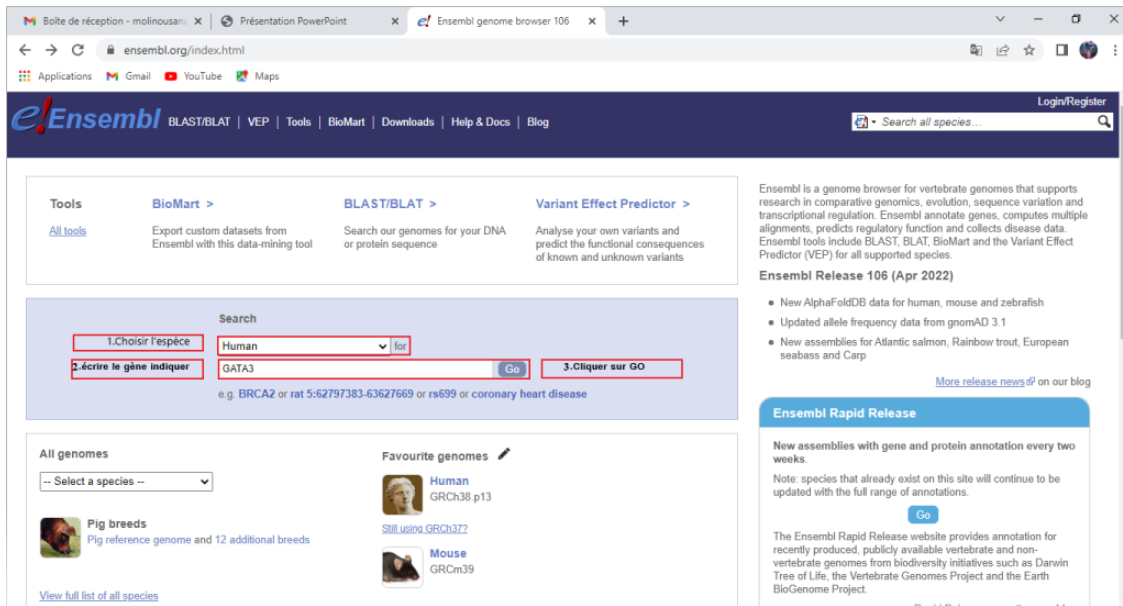


Figure 2.1. Plateforme de la base de données Ensembl. (1) spécifier l'espèce Humaine. (2) écrire le nom du gène *GATA3* ensuite (3) cliquer sur GO pour afficher les résultats du recherche (tous est encadrer en rouge).

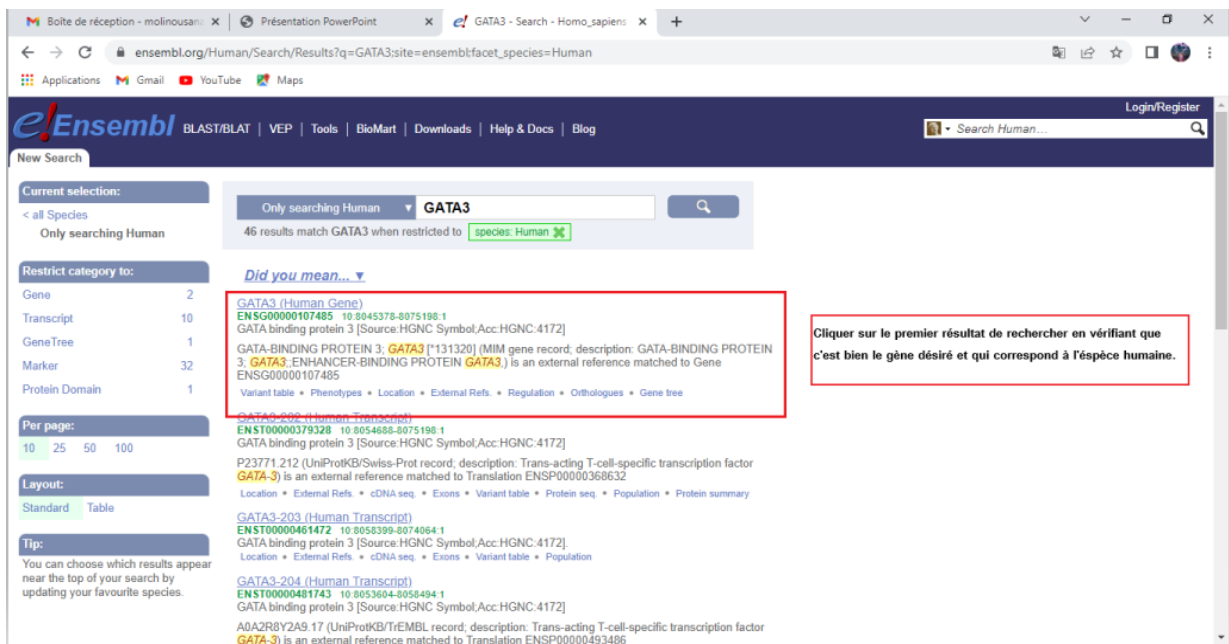


Figure 2.2. Résultats de la recherche du gène *GATA3*. Cliquer sur le premier résultat et vérifier le gène désiré et qui correspond à l'espèce humaine (Human Gene) (encadrer en rouge).

Chapitre 2. Matériel et méthodes

The screenshot shows the Ensembl genome browser interface for the GATA3 gene. The 'Sequence' tab is selected and highlighted in red. A red arrow points to the 'Cliquer' label next to the 'Sequence' tab. A red box highlights the text 'La première page indique les informations générale du gène.' at the top of the gene description. The page includes a table of transcripts and a 'Marked-up sequence' section.

Transcript ID	Name	bp	Protein	Biotype	CCDS	UniProt Match	RefSeq Match	Flags
ENST00000379328.9	GATA3-202	3083	444aa	Protein coding	CCDS31143	P23771-2	NM_001002295.2	MANE Select v0.95
ENST00000346208.4	GATA3-201	2650	443aa	Protein coding	CCDS7083	P23771-1	-	Ensembl Canonical
ENST00000481743.2	GATA3-204	975	143aa	Protein coding	-	A0A2R8Y2A9	-	GENCODE basic
ENST00000543001.1	GATA3-205	748	80aa	Protein coding	-	A0A2R8Y4T2	-	APPRIS ALT1
ENST00000461472.1	GATA3-203	895	No protein	Processed transcript	-	-	-	CDS 3' incomplete

Figure 2.3. Les caractéristiques du gène GATA3. La plateforme Ensembl montre les différentes caractéristiques du gène GATA3. Il faut cliquer sur Séquence pour afficher la séquence du gène GATA3 (en rouge).

La figure 2.4 montre la séquence du gène GATA3. Les caractères en rouge représentent les séquences codantes (exons), et les caractères en noir représentent les séquences non-codantes (introns).

The screenshot shows the 'Marked-up sequence' section of the GATA3 gene page. The sequence is displayed with exons highlighted in red and introns in black. A red box highlights a portion of the sequence, and a text box indicates 'Sélectionner une partie de la séquence et la coller sur un fichier Word.'

```

>Chromosome 10:GRCh38:1018044778:8075198:1
TGCACCTCCTAACTTTTACGGGGCACTACGGCTCAGAGAGATGAAAGTAAATGGGG
CGTTTTGGAGGCATCAGCATAGCAGAAACAGGAAATAGTCGAAAGGGAGGGAGAG
CCCTGGAGGGCAGAGACCTTAACTCTTCCACTCTCTAATGGATGCACTGCGCCGGRCCA
AGSCAGSCTCCCTGGTCCCAATGCTCCCAAAAGTGGAAAGAAATGCCATGCATGG
GTTTAGCCCTATGGTAAAGTCCCTCAGACTCTGAAAGCACTGTAGTGTAAATCC
AACCTTGCCAGAGACAGCGGGCTGTGCAAGGCGCAGGGGCGGTGCACTTTCAGGCGCG
CTTCCCAACCCCGCCAGATCTGTCACTTTCACACACCCCTGATGTGGGTTTGCCTGT
TTGCAAAAGGGGGTAAATTCATTCCTCGTGTCTTCTCCTCCCTCCCTCCCTTCCCT
CTTCGACACCCGAGAGACTCCGCTCTCTACAGTGGCAGGAGAAAGCCGAGGGGAGGGG
GCTCCGAGAACTAACTAGAAAGCTCTTATGTCTTTGGTCCACTGCACTGAAATCT
GGGTGAGCAGTTCACAGCGCCAGGAGCGGCGCCACAGTGGCGAAGCTCCGCTG
TCATTTCTGGCTTCAGATCTCCCGCGGATCCAGGAAAAAATAAAAAACAGCTCGCCCT
CGGGAGCGAGCTGCCAAGTTCAGTGAATCACTCTTCTCTCTAACTCCGCACTCC
CTCTGCCCTCCACTGGAGAAATAGSAGSAGSAGSAGSAGSAGSAGSAGSAGSAGSAGS
CTCTGAAAGAACTAACTAGAAAGCTCTTATGTCTTTGGTCCACTGCACTGAAATCT
CTGGTCTCTGGTGGCTTGGGCGGTAAGGTTGTGAGTGTGGATGTCTGCTGCTT
GCGGAAAGAGCTGGTAAAGTAGGGATGTGAAAGAAACCCCAAGGAAATGAGAGCC
CGTGGAAATCTTGGAAAGGGCGGAGACAGTITCCCACTGCAAGGGAGGGCAGAGATT
GGGAAACACCCCTTGGCCAGAGSCTTCTCTAAAGGGTGGCTCAGTGTCAATTTCA
ATGTTTATTTCTCTGTAAAGGTGGTGTGAGGCTCATGTCTGCACTAATGTA
AAGAAACAGCTCTGCTCTGTAAAGTAAAGTTGAAACCCAGATGTGTCTGCACTGCAATA
CCCCCGGAACTAGGGGTCGGAGGCTCTTCTTCCAGGAGCACCTCGAGTGGGTG
AGAAACCGCAGCTCCCGAGAGGTCGCCAGGGSCATCGAAAGGAAAGGGCAGAGAG
GACAAATTTGACTTAACTCCCGGACAGCAGACCAACAGSAGCTCCAAAGAGTCACTCA
GAGSAGTTCCTCCCTGAGAGAGATTTTAAAGTCTCAAGAGAGTGGAGSAGTGG
GCAAGCAGCTGCTTACATGCTTTCTTCTCTGAGACCCCAAGGAGGCTCGAGG
AAAGTGAACCGGTGATCTGCAAGGCGAGGGGAAAGTGGGCACTCTCCCTGGCTT
    
```

Figure 2.4. La séquence du gène GATA3 par la plateforme Ensembl. Sélectionner une partie de la séquence et la copier dans un document Word.

Pour faciliter notre recherche on utilise des amorces spécifiques du gène *GATA3*, qui comporte les introns et les exons, comme montré dans cette figure. Cette séquence est copiée dans un document Word. Dans ce travail, nous avons choisi la séquence comportant l'exon 1 (figure 2.5).



Figure2.5.La séquence de l'exon 1 du gène *GATA3*.

- Les exons sont représentés en rouge, et les séquences non codantes sont représentées en noir.

2.2.2. Le design des Primers : L'outil Primer-BLAST

A l'aide de National Center for Biotechnology Information (NCBI), on utilise l'outil Primer-BLAST dans le site « www.ncbi.nlm.nih.gov » pour la conception des amorces spécifique du gène *GATA3* (figure2.3) (Ye et al., 2012).

Les figures 2.6, 2.7 et 2.8 représentent les différentes étapes à suivre pour l'utilisation de cette plateforme.

Chapitre2.Matériel et méthodes

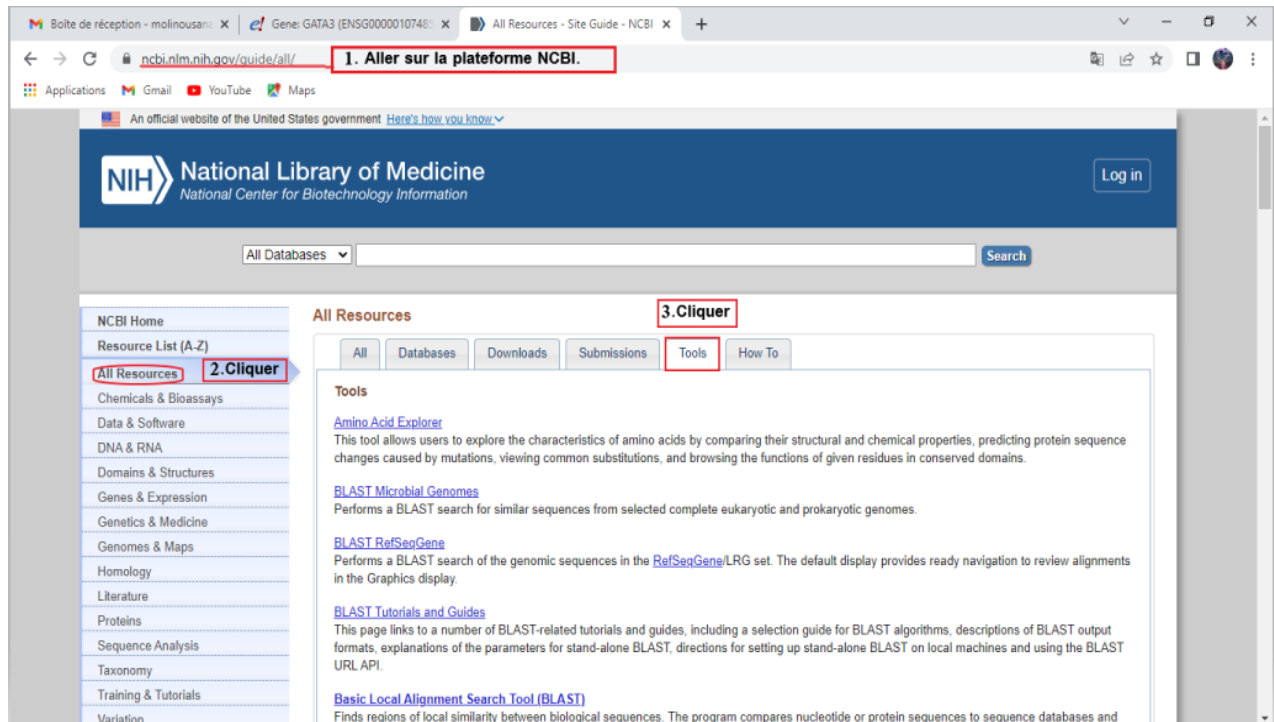


Figure2.6.Le site NCBI.

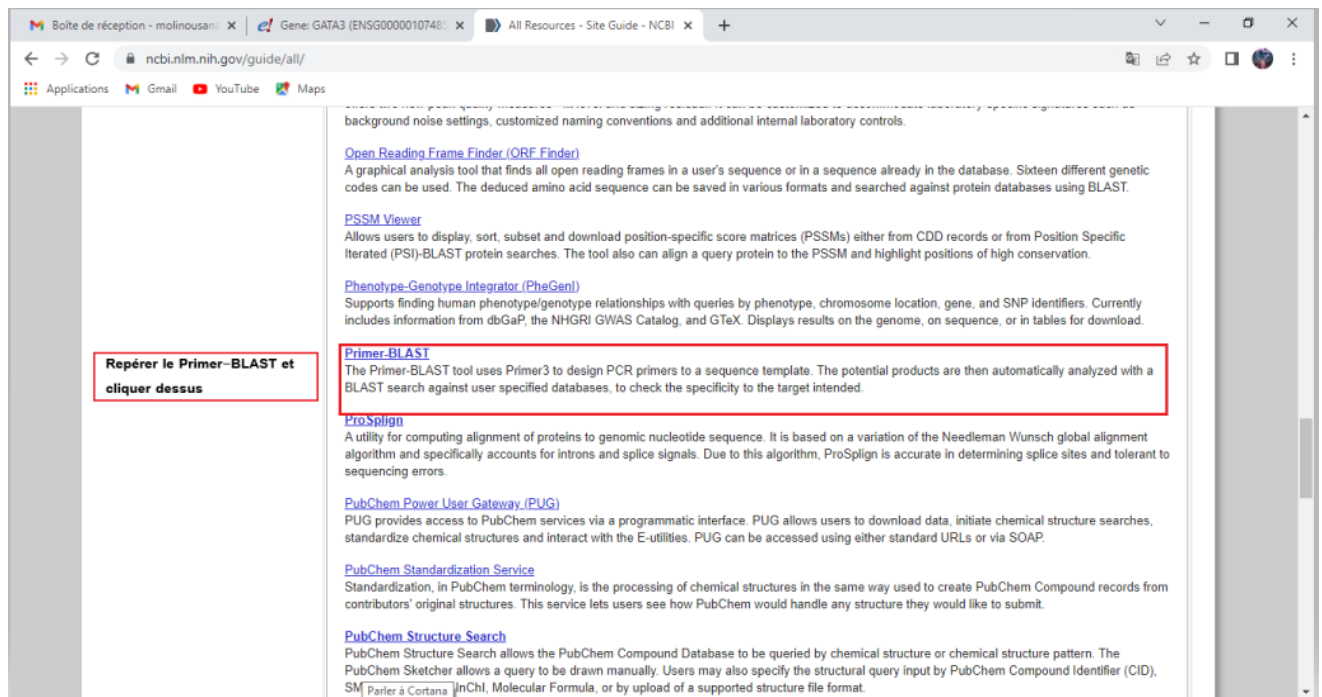


Figure 2.7.L'outil Primer-BLAST.

The screenshot shows the Primer-BLAST web interface. The main heading is "Primer-BLAST" with a sub-heading "1. La page du logiciel s'affichera comme ainsi" (highlighted in red). Below this, there are tabs for "Primers for target on one template" and "Primers common for a group of sequences". The "PCR Template" section contains a text area with a DNA sequence (highlighted in red) and a "3. Ecrire le nombre '1' dans la case 'From'" annotation. To the right, there are input fields for "Forward primer" (with "1" in the "From" field, highlighted in red) and "Reverse primer" (with "420" in the "From" field, highlighted in red). A "6. Laisser cette case libre" annotation points to the "To" field of the reverse primer. Below the sequence, there are "Primer Parameters" including "PCR product size" (Min: 70, Max: 1000) and "Primer melting temperatures (T_m)" (Min: 57.0, Opt: 60.0, Max: 63.0, Max T_m difference: 3). A "4. Ecrire le nombre de la 'Forward primer' dans la case 'To'" annotation points to the "To" field of the forward primer, and a "5. Ecrire le nombre de la 'Reverse Primer' dans la case 'from'" annotation points to the "From" field of the reverse primer. A "3. Copier et coller la séquence d'intérêt encadrer ici et supprimer toutes les espaces" annotation points to the sequence text area.

Figure 2.8. L'outil Primer-BLAST. (1) La page du logiciel s'affichera comme dans la figure dessus, (2) copier la région d'intérêt encadrer dans document Word et la coller dans la case « Enter accession, gi, or FASTA sequence » (encadrer en rouge), puis supprimer les espaces entre les lignes (indiquer par la flèche rouge et l'espace en bleu), ensuite (3,4,5,6) on détermine les amorces sens et anti-sens (Forward et Reverse Primers).

➤ Ensuite, nous avons sélectionné certaines caractéristiques afin d'obtenir nos résultats.

The screenshot shows the "Primer Pair Specificity Checking Parameters" section of the Primer-BLAST interface. The "Specificity check" section has a checked box for "Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template". The "Search mode" is set to "Automatic". The "Database" dropdown is set to "Genomes for selected organisms (primary reference assembly only)" (highlighted in red with annotation "1. Sélectionner cette case en choisissant 'Genomes for for selected organisms'"). The "Organism" dropdown is set to "Homo sapiens" (highlighted in red with annotation "2. vérifier que c'est bien l'espace voulue."). The "Primer specificity stringency" section has "Primer must have at least 2 total mismatches to unintended targets, including at least 2 mismatches within the last 5 bps at the 3' end." and "Ignore targets that have 6 or more mismatches to the primer." The "Max target amplicon size" is set to 4000. The "Allow splice variants" section has a checked box for "Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input)". At the bottom, there is a "4. Cliquer sur 'Get Primer' pour afficher les résultats." annotation pointing to the "Get Primers" button, and a "3. Cocher ce carré values that differ from the default are highlighted in yellow" annotation pointing to a checked box for "Show results in a new window".

Figure 2.9. Paramètres de vérification de la spécificité des paires d'amorces (Primer Pair Specificity Checking Parameters). Faire défiler la page en bas, puis (1) sélectionner la case où c'est écrit « RefSeq mRNA » et choisir « Genomes for selected organisms », (2) vérifier l'espèce que c'est bien « Homo sapiens », (3) cocher la case « Show results in a new window » pour que les résultats s'afficheront dans une nouvelle fenêtre et après (4) cliquer sur « Get Primers » pour afficher les résultats.

- Les amorces choisies doivent répondre aux critères qui ont cité en haut.

2.2.3. Confirmation des résultats par *In-Silico* PCR

Une analyse de confirmation de la paire d'amorces qu'on a choisie a été effectuée par *In-Silico* PCR (PCR virtuelle), qui se fait par un programme dans la plateforme «genome.ucsc.edu» (figure 2.7 et figure 2.8).

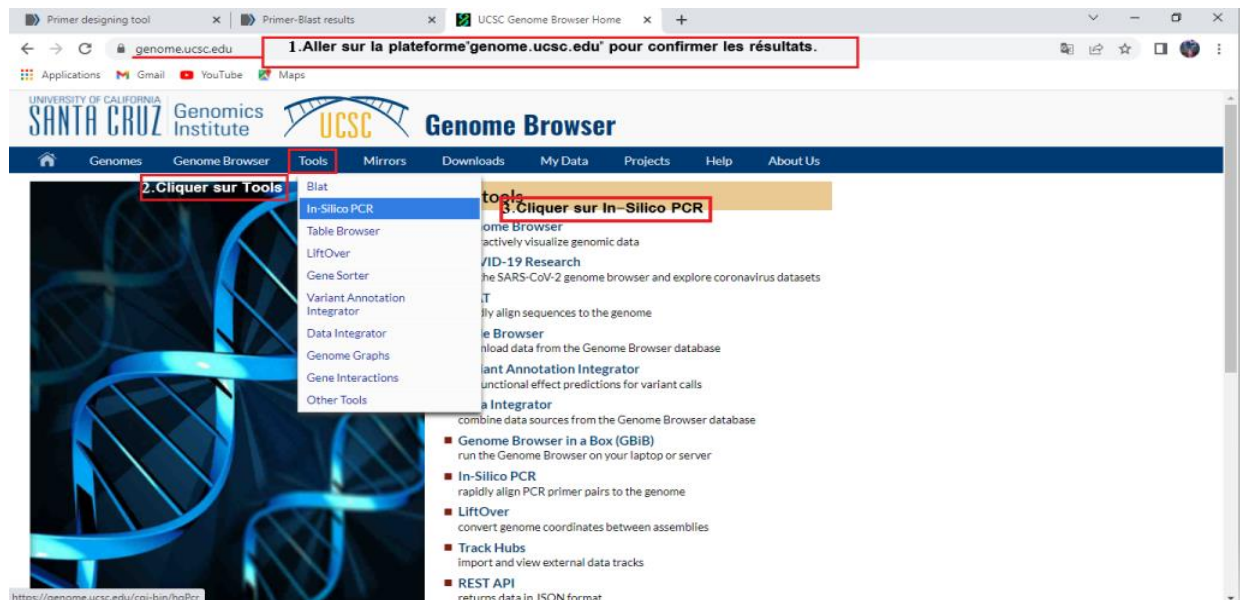


Figure 2.10. Plateforme du site « genome.ucsc.edu ». Confirmation des résultats par la plateforme « UCSC genome browser ». (1) Aller sur la plateforme « UCSC genome browser », (2) cliquer sur « Tools », (3) cliquer sur « *In-Silico* PCR ».

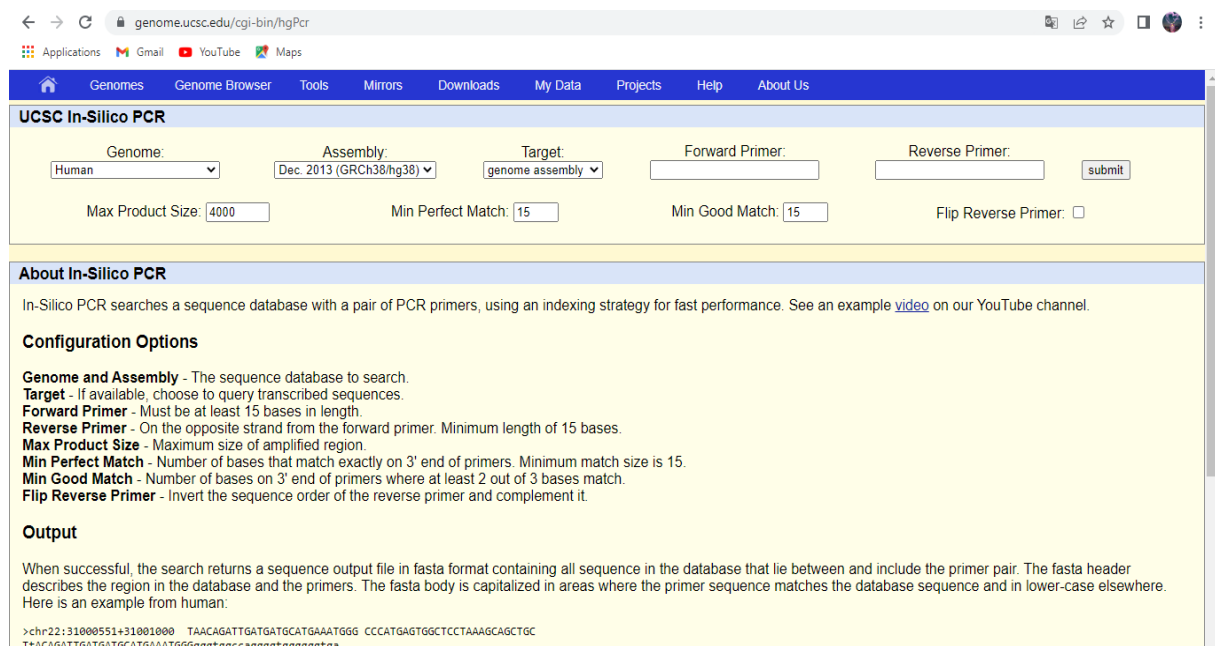


Figure2.11. Le site *In-Silico* PCR.

Chapitre 3. Résultats et discussions

3.1. Résultats de la conception des amorces

3.1.1. Résultats du Primer-BLAST

Pour concevoir nos amorces spécifiques à l'exon 1 du gène *GATA3*, nous avons utilisé le site Ensembl pour avoir l'intégrité du gène *GATA3*. Ce dernier est composé de 6 exons. Dans cette étude, le premier exon a été choisi pour sa taille idéale pour le site Primer. Ensuite, nous utilisons l'outil Primer-BLAST base de données NCBI. Ce dernier nous permet d'avoir 10 paires d'amorces gène *GATA3* spécifique de l'exon 1.

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 3.1.

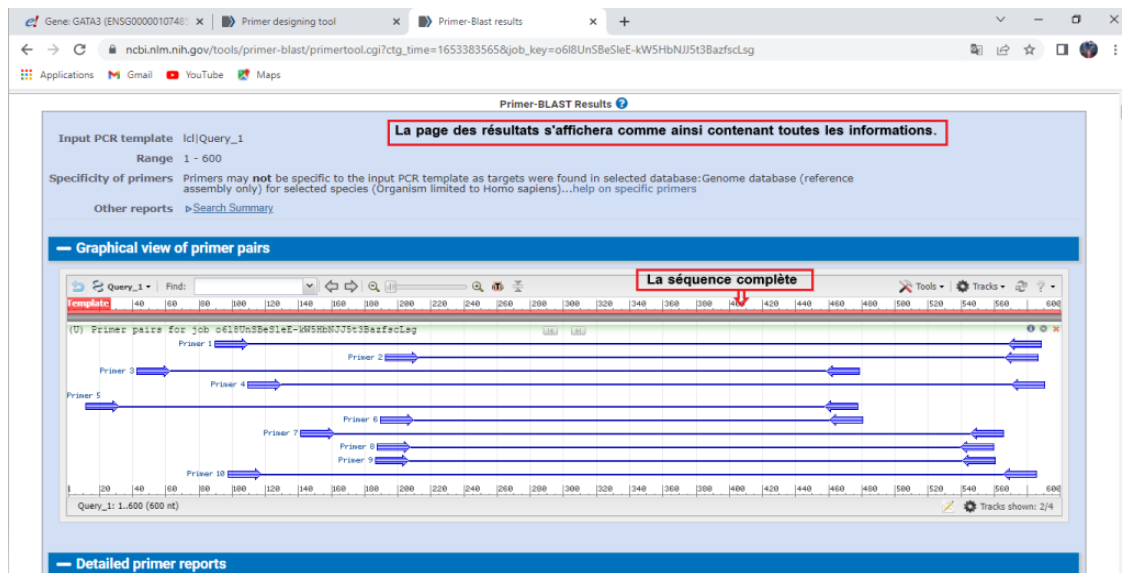


Figure 3.1. Résultats du Primer-BLAST.

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCTGTTTCTCCTTCCCTCCC	Plus	20	90	109	60.03	60.00	2.00	0.00
Reverse primer	CCACACACTCACACCGTA	Minus	20	588	569	59.90	55.00	3.00	2.00
Product length	499								

Figure 3.2. Primer pair 1.

Primer pair 4

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCCTGTAACCTGCCAGAAG	Plus	20	55	74	60.68	60.00	5.00	2.00
Reverse primer	AGTGCGGAGTTAGAGGGGA	Minus	20	478	459	59.67	55.00	2.00	0.00
Product length	424								

Figure 3.3. Primer pair 4.

Nous avons choisi la première paire d'amorces et les raisons suivantes :

- La taille de notre paire d'amorces choisie est de 499 paires de bases (Figure 3.2). Cette taille est comprise entre 250 à 900 paires bases. Le respect de ce critère est important à fin d'éviter le phénomène de saturation. En effet, plus la taille de l'amorce est supérieure à 1000 paires de bases, plus l'amorce devient difficile à amplifier.
 - Pour de meilleurs résultats d'hybridation, l'amorce a besoin d'une température entre 55°C à 72°C (cette température correspond à une longueur de l'amorce de 18-24 bases). Notre paire répond parfaitement à ce critère car sa température correspond 60°C (Figure 3.2).
 - La longueur des amorces est proportionnelle à l'efficacité de l'hybridation. De plus, la température d'hybridation doit être optimale pour une longueur d'amorce entre 18 à 24 bases. Dans ce cas, nous avons choisi la paire d'amorces d'une taille de 20 nucléotides (Figure 3.2). Plus l'amorce est longue, moins l'hybridation est efficace.
 - Enfin, La teneur en GC est de 60% pour l'amorce du brin sens et 55% pour l'amorce du brin anti-sens choisi. Ce pourcentage est compris entre 40 et 60%.
- Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 3.2.

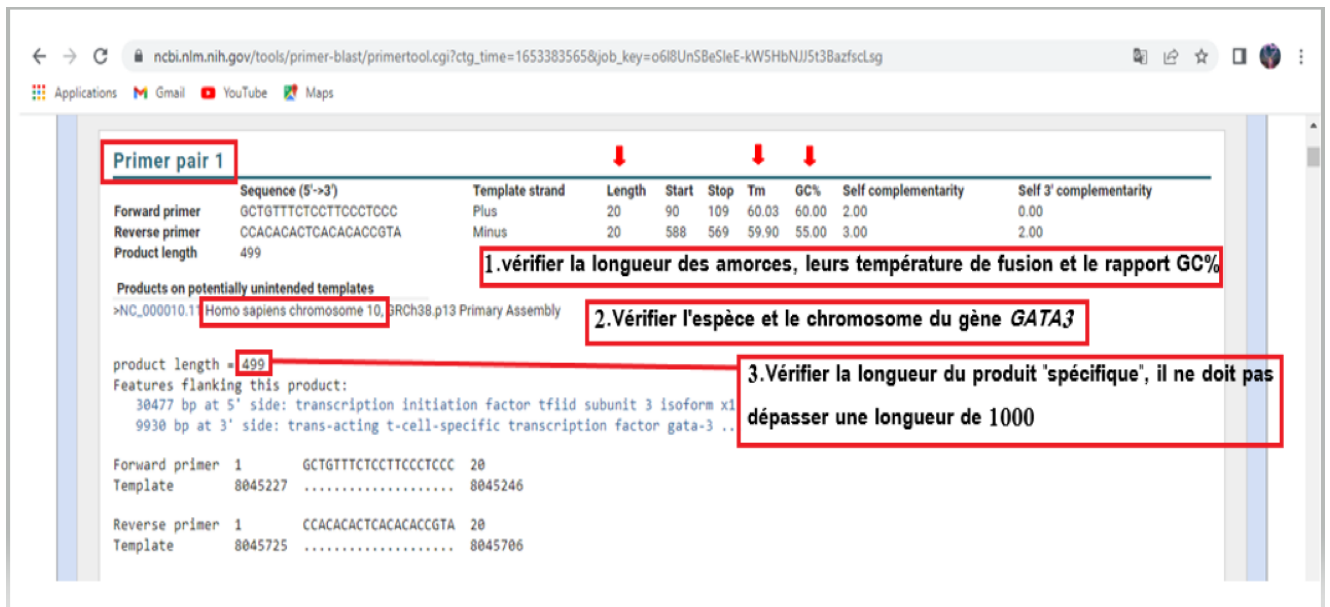


Figure 3.4. Résultats du Primer-BLAST. (1) il faut vérifier la longueur des amorces, leurs températures d'hybridation et le rapport GC%, ensuite (2) il faut vérifier que c'est bien l'espèce et le chromosome du gène voulu, puis (3) vérifier la longueur du produit spécifique < 1000pb.

Chapitre 3. Résultats et discussions

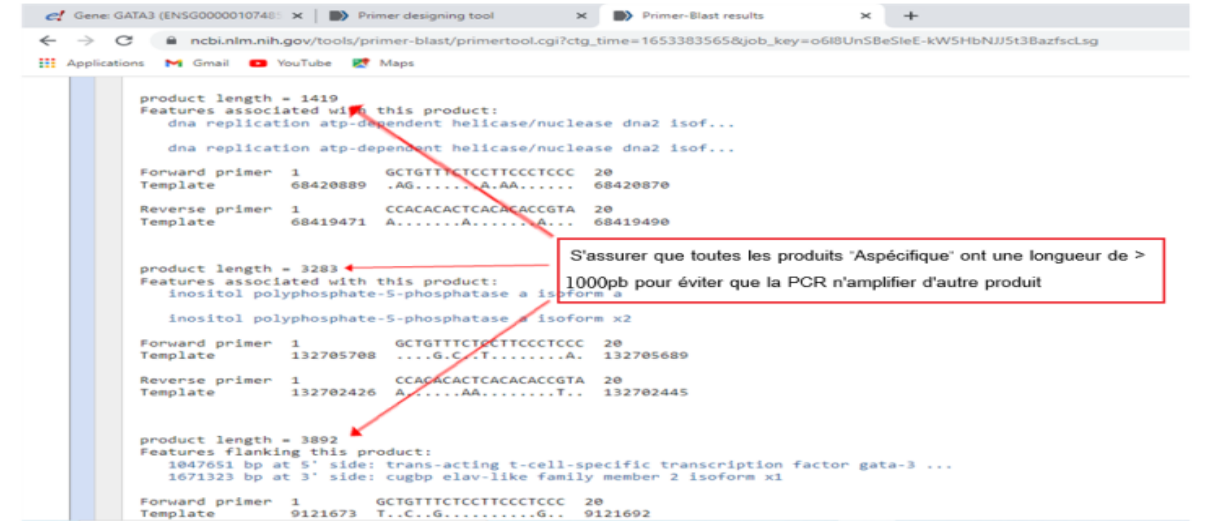


Figure 3.5. Résultats du Primer-BLAST. Vérifier la longueur du produit spécifique < 1000pb et (4) s'assurer que toutes les produits aspécifique ont une longueur de > 1000pb.

- Ensuite, nous avons situé notre paire d'amorces dans la séquence du gène *GATA3* (Figure 3.6).

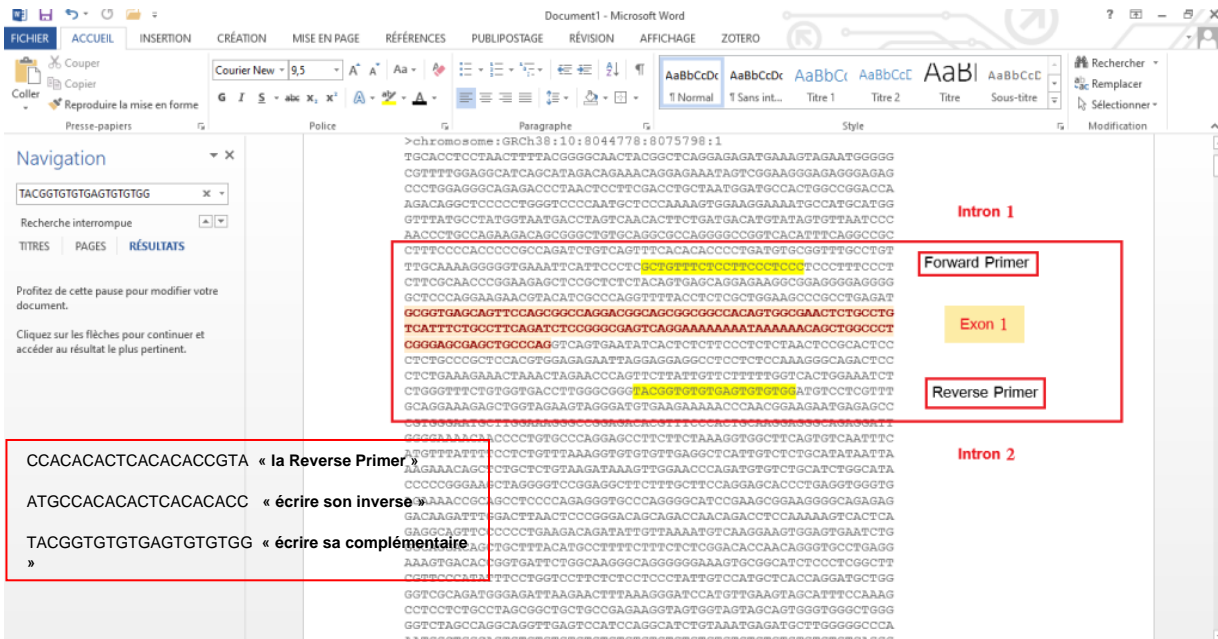


Figure 3.6. Les amorces encadrant la région d'intérêt. La Paire d'amorces N°1 (en orange) encadrant la partie de la séquence de l'ADN qu'on veut amplifier du gène *GATA3*; Forward Primer (amorce sens) (GCTGTTTCTCCTTCCCTCCC), Reverse Primer (amorce anti-sens) (TACGGTGTGTGAGTGTGTGG).

Chapitre 3. Résultats et discussions

3.1.2. Résultats d'*In-silico* PCR

Les résultats obtenus nous ont confirmés la taille du produit spécifique obtenus 499 pb ainsi que la spécificité des amorces conçues, les informations obtenues confirment aussi le chromosome 10 porteur du gène *GATA3*, la séquence des amorces et la température d'hybridation (Figure 3.8). Donc, ce résultat nous confirme la fiabilité des amorces que nous avons choisies.

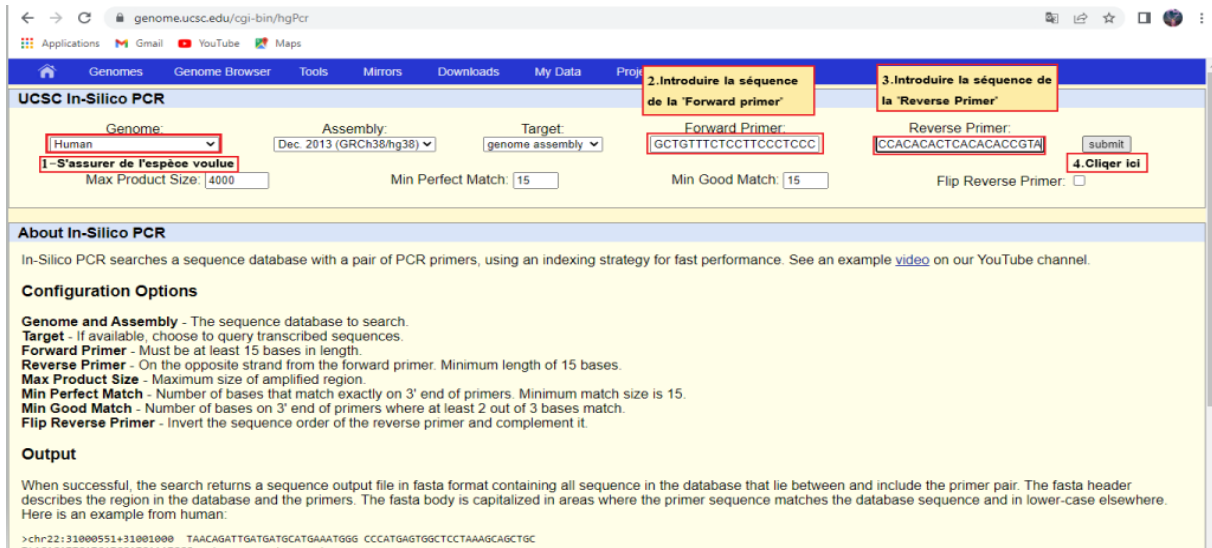


Figure 3.7. Confirmation des résultats sur la plateforme « UCSC genome browser ». (1) s'assurer l'espèce voulue. (2) entrer la séquence de la Forward Primer (l'amorce sens). (3) entrer la séquence de la Reverse Primer (l'amorce anti-sens) et (4) Cliquer sur submit.

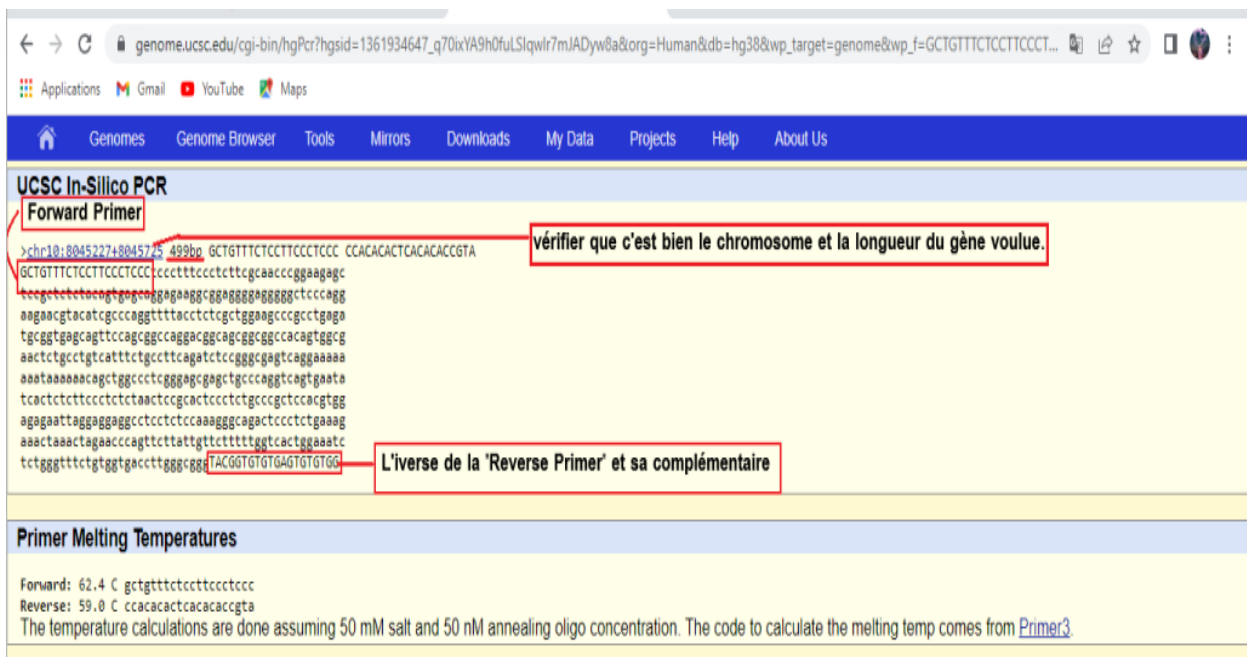


Figure 3.8. Résultats de la confirmation. Un seul résultat est affiché comme en dessus, vérifier si la taille et le chromosome sont les mêmes que ceux du gène *GATA3*.

Chapitre 4. Conclusions et perspectives

Les ILCs sont considérées comme une famille des cellules effectrices de l'immunité innée. Ces cellules se caractérisent par l'absence de récepteurs spécifiques aux antigènes par une diversité fonctionnelle proche de celle des effecteurs T helper (Th) de la réponse adaptative. On distingue trois principaux groupes d'ILCs. Les ILCs de type 1, constituées des cellules cNK et ILC1s productrices d'IFN- γ . Les ILCs de type 2, productrices d'IL-13, d'IL-5 et d'IL-4, comme les cellules Th2, interviennent dans la réponse innée mucoale aux parasites intestinaux, et participent aux réactions inflammatoires et allergiques. Les ILCs de type 3 sécrétrices de l'IL-17 et de l'IL-22, au même titre que les cellules Th17. Il est à noter que les ILC2s se distinguent par l'expression du facteur de transcription GATA3 qui joue un rôle central dans la régulation et la différenciation de ces cellules. L'étude de son taux d'expression par les ILC2s au cours des infections parasitaires offrirait de nouvelles pistes dans les domaines thérapeutique et diagnostique.

La PCR est une méthode couramment utilisée pour amplifier l'ADN d'intérêt dans de nombreux domaines, notamment la recherche biomédicale, les tests de diagnostic et les tests médico-légaux. Plusieurs paramètres peuvent influencer le résultat d'une PCR, notamment la préparation de l'ADN matrice, les conditions de la réaction et la fiabilité des amorces utilisées. L'utilisation des outils de la bioinformatique tel que l'outil de conception d'amorce (Primer-BLAST) nous a permis de concevoir des amorces encadrant l'exon 1 du gène *GATA3*.

La réalisation d'une PCR afin de tester la fiabilité de la paire d'amorces choisi reste une étape indispensable.

Chapitre 5. Bibliographie

A

Abt, M.C., Lewis, B.B., Caballero, S., Xiong, H., Carter, R.A., Sušac, B., Ling, L., Leiner, I., and Pamer, E.G. (2015). Innate Immune Defenses Mediated by Two ILC Subsets Are Critical for Protection against Acute *Clostridium difficile* Infection. *Cell Host & Microbe* 18, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.06.011>.

Ahrberg, C.D., Manz, A., and Chung, B.G. (2016). Polymerase chain reaction in microfluidic devices. *Lab Chip* 16, 3866–3884. <https://doi.org/10.1039/C6LC00984K>.

Almeida, F.F., and Belz, G.T. (2016). Innate lymphoid cells: models of plasticity for immune homeostasis and rapid responsiveness in protection. *Mucosal Immunol* 9, 1103–1112. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.64>.

Artis, D., and Spits, H. (2015). The biology of innate lymphoid cells. *Nature* 517, 293–301. <https://doi.org/10.1038/nature14189>.

B

Bal, S.M., Golebski, K., and Spits, H. (2020). Plasticity of innate lymphoid cell subsets. *Nat Rev Immunol* 20, 552–565. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0282-9>.

Bernink, J.H., Peters, C.P., Munneke, M., te Velde, A.A., Meijer, S.L., Weijer, K., Hreggvidsdottir, H.S., Heinsbroek, S.E., Legrand, N., Buskens, C.J., et al. (2013). Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nat Immunol* 14, 221–229. <https://doi.org/10.1038/ni.2534>.

Bhat, A.I., and Rao, G.P. (2020). *Characterization of plant viruses: methods and protocols* (New York, NY: Humana Press).

Boos, M.D., Yokota, Y., Eberl, G., and Kee, B.L. (2007). Mature natural killer cell and lymphoid tissue-inducing cell development requires Id2-mediated suppression of E protein activity. *Journal of Experimental Medicine* 204, 1119–1130. <https://doi.org/10.1084/jem.20061959>.

Bresnick, E.H., Katsumura, K.R., Lee, H.-Y., Johnson, K.D., and Perkins, A.S. (2012). Master regulatory GATA transcription factors: mechanistic principles and emerging links to hematologic malignancies. *Nucleic Acids Research* 40, 5819–5831. <https://doi.org/10.1093/nar/gks281>.

Buonocore, S., Ahern, P.P., Uhlig, H.H., Ivanov, I.I., Littman, D.R., Maloy, K.J., and Powrie, F. (2010). Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. *Nature* 464, 1371–1375. <https://doi.org/10.1038/nature08949>.

C

Cella, M., and Robinette, M.L. (2021). Intraepithelial ILC1-like cells: Front-line fighters in human head and neck squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 118, e2110875118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2110875118>.

Cherrier, M. (2014). Les cellules lymphoïdes innées: De nouveaux acteurs de la réponse immune mucoale. *Med Sci (Paris)* 30, 280–288. <https://doi.org/10.1051/medsci/20143003016>.

Chapitre 5. Bibliographie

Chlon, T.M., and Crispino, J.D. (2012). Combinatorial regulation of tissue specification by GATA and FOG factors. *Development* 139, 3905–3916. <https://doi.org/10.1242/dev.080440>.

Clark, J.T., Christian, D.A., Gullicksrud, J.A., Perry, J.A., Park, J., Jacquet, M., Tarrant, J.C., Radaelli, E., Silver, J., and Hunter, C.A. (2021). IL-33 promotes innate lymphoid cell-dependent IFN- γ production required for innate immunity to *Toxoplasma gondii*. *ELife* 10, e65614. <https://doi.org/10.7554/eLife.65614>.

Colonna, M. (2018). Innate Lymphoid Cells: Diversity, Plasticity, and Unique Functions in Immunity. *Immunity* 48, 1104–1117. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.05.013>.

Constantinides, M.G., McDonald, B.D., Verhoef, P.A., and Bendelac, A. (2014). A committed precursor to innate lymphoid cells. *Nature* 508, 397–401. <https://doi.org/10.1038/nature13047>.

Crinier, A., Viant, C., Girard-Madoux, M., and Vivier, É. (2017a). Les cellules lymphoïdes innées. *Med Sci (Paris)* 33, 534–542. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173305018>.

Crinier, A., Viant, C., Girard-Madoux, M., and Vivier, É. (2017b). Les cellules lymphoïdes innées. *Med Sci (Paris)* 33, 534–542. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173305018>.

Cruz, A.A., Cooper, P.J., Figueiredo, C.A., Alcantara-Neves, N.M., Rodrigues, L.C., and Barreto, M.L. (2017). Global issues in allergy and immunology: Parasitic infections and allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 140, 1217–1228. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.09.005>.

D

Daussy, C., Faure, F., Mayol, K., Viel, S., Gasteiger, G., Charrier, E., Biennu, J., Henry, T., Debien, E., Hasan, U.A., et al. (2014). T-bet and Eomes instruct the development of two distinct natural killer cell lineages in the liver and in the bone marrow. *Journal of Experimental Medicine* 211, 563–577. <https://doi.org/10.1084/jem.20131560>.

De Salvo, C., Buela, K.-A., and Pizarro, T.T. (2020). Cytokine-Mediated Regulation of Innate Lymphoid Cell Plasticity in Gut Mucosal Immunity. *Front. Immunol.* 11, 585319. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.585319>.

Djuretic, I.M., Levanon, D., Negreanu, V., Groner, Y., Rao, A., and Ansel, K.M. (2007). Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nat Immunol* 8, 145–153. <https://doi.org/10.1038/ni1424>.

Duerr, C.U., McCarthy, C.D.A., Mindt, B.C., Rubio, M., Meli, A.P., Pothlichet, J., Eva, M.M., Gauchat, J.-F., Qureshi, S.T., Mazer, B.D., et al. (2016). Type I interferon restricts type 2 immunopathology through the regulation of group 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol* 17, 65–75. <https://doi.org/10.1038/ni.3308>.

Dunay, I.R., DaMatta, R.A., Fux, B., Presti, R., Greco, S., Colonna, M., and Sibley, L.D. (2008). Gr1+ Inflammatory Monocytes Are Required for Mucosal Resistance to the Pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity* 29, 306–317. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.05.019>.

E

Elkins, K.M. (2015). Primer Design for PCR Reactions in Forensic Biology. In *PCR Primer Design*, C. Basu, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 17–30.

Erick, T.K., and Brossay, L. (2016). Phenotype and functions of conventional and non-conventional NK cells. *Current Opinion in Immunology* 38, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.11.007>.

F

Fox, A.H., Kowalski, K., King, G.F., Mackay, J.P., and Crossley, M. (1998). Key Residues Characteristic of GATA N-fingers Are Recognized By FOG. *Journal of Biological Chemistry* 273, 33595–33603. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.50.33595>.

Frelin, C., Herrington, R., Janmohamed, S., Barbara, M., Tran, G., Paige, C.J., Benveniste, P., Zuñiga-Pflücker, J.-C., Souabni, A., Busslinger, M., et al. (2013). GATA-3 regulates the self-renewal of long-term hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* 14, 1037–1044. <https://doi.org/10.1038/ni.2692>.

Fuchs, A. (2016). ILC1s in Tissue Inflammation and Infection. *Frontiers in Immunology* 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00104>.

Fuchs, A., Vermi, W., Lee, J.S., Lonardi, S., Gilfillan, S., Newberry, R.D., Cella, M., and Colonna, M. (2013a). Intraepithelial Type 1 Innate Lymphoid Cells Are a Unique Subset of IL-12- and IL-15-Responsive IFN- γ -Producing Cells. *Immunity* 38, 769–781. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.02.010>.

Fuchs, A., Vermi, W., Lee, J.S., Lonardi, S., Gilfillan, S., Newberry, R.D., Cella, M., and Colonna, M. (2013b). Intraepithelial Type 1 Innate Lymphoid Cells Are a Unique Subset of IL-12- and IL-15-Responsive IFN- γ -Producing Cells. *Immunity* 38, 769–781. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.02.010>.

Fuchs, A., Vermi, W., Lee, J.S., Lonardi, S., Gilfillan, S., Newberry, R.D., Cella, M., and Colonna, M. (2013c). Intraepithelial Type 1 Innate Lymphoid Cells Are a Unique Subset of IL-12- and IL-15-Responsive IFN- γ -Producing Cells. *Immunity* 38, 769–781. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.02.010>.

G

Garibyan, L., and Avashia, N. (2013). Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology* 133, 1–4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>.

Gaynor, K.U., Grigorieva, I.V., Nesbit, M.A., Cranston, T., Gomes, T., Gortner, L., and Thakker, R.V. (2009). A Missense GATA3 Mutation, Thr272Ile, Causes the Hypoparathyroidism, Deafness, and Renal Dysplasia Syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 94, 3897–3904. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-0717>.

Ghannam, M.G., and Varacallo, M. (2022). Biochemistry, Polymerase Chain Reaction. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.

H

Halim, T.Y.F., MacLaren, A., Romanish, M.T., Gold, M.J., McNagny, K.M., and Takei, F. (2012). Retinoic-Acid-Receptor-Related Orphan Nuclear Receptor Alpha Is Required for Natural Helper Cell Development and Allergic Inflammation. *Immunity* 37, 463–474. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.06.012>.

Harly, C., Cam, M., Kaye, J., and Bhandoola, A. (2018). Development and differentiation of early innate lymphoid progenitors. *Journal of Experimental Medicine* 215, 249–262. <https://doi.org/10.1084/jem.20170832>.

Harly, C., Kenney, D., Ren, G., Lai, B., Raabe, T., Yang, Q., Cam, M.C., Xue, H.-H., Zhao, K., and Bhandoola, A. (2019). The transcription factor TCF-1 enforces commitment to the innate lymphoid cell lineage. *Nat Immunol* 20, 1150–1160. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0445-7>.

Herberman, R.B., Nunn, M.E., Holden, H.T., and Lavrin, D.H. (1975). Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int. J. Cancer* 16, 230–239. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910160205>.

Herbert, D., Douglas, B., and Zullo, K. (2019). Group 2 Innate Lymphoid Cells (ILC2): Type 2 Immunity and Helminth Immunity. *IJMS* 20, 2276. <https://doi.org/10.3390/ijms20092276>.

Hoyler, T., Klose, C.S.N., Souabni, A., Turqueti-Neves, A., Pfeifer, D., Rawlins, E.L., Voehringer, D., Busslinger, M., and Diefenbach, A. (2012). The Transcription Factor GATA-3 Controls Cell Fate and Maintenance of Type 2 Innate Lymphoid Cells. *Immunity* 37, 634–648. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.06.020>.

I

Ishmael, F.T., and Stellato, C. (2008). Principles and applications of polymerase chain reaction: basic science for the practicing physician. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 101, 437–443. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)60323-7](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)60323-7).

J

Jakhesara, S.J., Rank, D.N., Kansara, J.D., Parikh, R.C., Patel, V.M., Vataliya, P.H., and Solanki, J.V. (2012). Parentage verification in field progeny testing program of Mehsana buffalo1. *Journal of Animal Science* 90, 4723–4728. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4353>.

Jalali, M., Zaborowska, J., and Jalali, M. (2017). The Polymerase Chain Reaction. In *Basic Science Methods for Clinical Researchers*, (Elsevier), pp. 1–18.

K

Kadri, K. (2020). Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. In *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*, M. L. Nagpal, O.-M. Boldura, C. Baltă, and S. Enany, eds. (IntechOpen), p.

Kanhere, A., Hertweck, A., Bhatia, U., Gökmen, M.R., Perucha, E., Jackson, I., Lord, G.M., and Jenner, R.G. (2012). T-bet and GATA3 orchestrate Th1 and Th2 differentiation through lineage-specific targeting of distal regulatory elements. *Nat Commun* 3, 1268. <https://doi.org/10.1038/ncomms2260>.

Klose, C.S.N., and Artis, D. (2016). Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nat Immunol* 17, 765–774. <https://doi.org/10.1038/ni.3489>.

Klose, C.S.N., and Artis, D. (2020). Innate lymphoid cells control signaling circuits to regulate tissue-specific immunity. *Cell Res* 30, 475–491. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0323-8>.

Klose, C.S.N., Kiss, E.A., Schwierzeck, V., Ebert, K., Hoyler, T., d'Hargues, Y., Göppert, N., Croxford, A.L., Waisman, A., Tanriver, Y., et al. (2013). A T-bet gradient controls the fate and function of CCR6–RORγt+ innate lymphoid cells. *Nature* 494, 261–265. <https://doi.org/10.1038/nature11813>.

Klose, C.S.N., Flach, M., Möhle, L., Rogell, L., Hoyler, T., Ebert, K., Fabiunke, C., Pfeifer, D., Sexl, V., Fonseca-Pereira, D., et al. (2014). Differentiation of Type 1 ILCs from a Common Progenitor to All Helper-like Innate Lymphoid Cell Lineages. *Cell* 157, 340–356. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.030>.

Korchagina, A.A., Koroleva, E., and Tumanov, A.V. (2021). Innate Lymphoid Cells in Response to Intracellular Pathogens: Protection Versus Immunopathology. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11, 775554. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.775554>.

Kruglov, A.A., Grivennikov, S.I., Kuprash, D.V., Winsauer, C., Prepens, S., Seleznik, G.M., Eberl, G., Littman, D.R., Heikenwalder, M., Tumanov, A.V., et al. (2013). Nonredundant Function of Soluble LT α ₃ Produced by Innate Lymphoid Cells in Intestinal Homeostasis. *Science* 342, 1243–1246. <https://doi.org/10.1126/science.1243364>.

Ku, C.-J., Hosoya, T., Maillard, I., and Engel, J.D. (2012). GATA-3 regulates hematopoietic stem cell maintenance and cell-cycle entry. *Blood* 119, 2242–2251. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-366070>.

Kurek, D., Garinis, G.A., van Doorninck, J.H., van der Wees, J., and Grosveld, F.G. (2007). Transcriptome and phenotypic analysis reveals Gata3-dependent signalling pathways in murine hair follicles. *Development* 134, 261–272. <https://doi.org/10.1242/dev.02721>.

L

Liao, C.-P., Booker, R.C., Morrison, S.J., and Le, L.Q. (2017). Identification of hair shaft progenitors that create a niche for hair pigmentation. *Genes Dev.* 31, 744–756. <https://doi.org/10.1101/gad.298703.117>.

Lorenz, T.C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *JoVE* 3998. <https://doi.org/10.3791/3998>.

Löser, S., Smith, K.A., and Maizels, R.M. (2019). Innate Lymphoid Cells in Helminth Infections—Obligatory or Accessory? *Front. Immunol.* 10, 620. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00620>.

M

Maizels, R.M., and McSorley, H.J. (2016). Regulation of the host immune system by helminth parasites. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 138, 666–675. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.07.007>.

Melo-Gonzalez, F., and Hepworth, M.R. (2017). Functional and phenotypic heterogeneity of group 3 innate lymphoid cells. *Immunology* 150, 265–275. <https://doi.org/10.1111/imm.12697>.

Mielke, L.A., Groom, J.R., Rankin, L.C., Seillet, C., Masson, F., Putoczki, T., and Belz, G.T. (2013). TCF-1 Controls ILC2 and NKp46⁺ ROR γ ^t Innate Lymphocyte Differentiation and Protection in Intestinal Inflammation. *J.I.* 191, 4383–4391. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301228>.

Mjösberg, J., Bernink, J., Golebski, K., Karrich, J.J., Peters, C.P., Blom, B., te Velde, A.A., Fokkens, W.J., van Drunen, C.M., and Spits, H. (2012). The Transcription Factor GATA3 Is Essential for the Function of Human Type 2 Innate Lymphoid Cells. *Immunity* 37, 649–659. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.08.015>.

Chapitre 5. Bibliographie

Molofsky, A.B., Nussbaum, J.C., Liang, H.-E., Van Dyken, S.J., Cheng, L.E., Mohapatra, A., Chawla, A., and Locksley, R.M. (2013). Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages. *Journal of Experimental Medicine* 210, 535–549. <https://doi.org/10.1084/jem.20121964>.

Molofsky, A.B., Van Gool, F., Liang, H.-E., Van Dyken, S.J., Nussbaum, J.C., Lee, J., Bluestone, J.A., and Locksley, R.M. (2015). Interleukin-33 and Interferon- γ Counter-Regulate Group 2 Innate Lymphoid Cell Activation during Immune Perturbation. *Immunity* 43, 161–174. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.05.019>.

Montaldo, E., Juelke, K., and Romagnani, C. (2015). Group 3 innate lymphoid cells (ILC3s): Origin, differentiation, and plasticity in humans and mice: Highlights - (Mini-Review). *Eur. J. Immunol.* 45, 2171–2182. <https://doi.org/10.1002/eji.201545598>.

Moro, K., Kabata, H., Tanabe, M., Koga, S., Takeno, N., Mochizuki, M., Fukunaga, K., Asano, K., Betsuyaku, T., and Koyasu, S. (2016). Interferon and IL-27 antagonize the function of group 2 innate lymphoid cells and type 2 innate immune responses. *Nat Immunol* 17, 76–86. <https://doi.org/10.1038/ni.3309>.

Mougeot, G. (2001). Infections à protozoaires et environnement. *Revue Française des Laboratoires* 2001, 25–31. [https://doi.org/10.1016/S0338-9898\(01\)80386-3](https://doi.org/10.1016/S0338-9898(01)80386-3).

Mullis, K.B. (1990). The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Sci Am* 262, 56–65. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0490-56>.

N

Nabekura, T., and Shibuya, A. (2021). Type 1 innate lymphoid cells: Soldiers at the front line of immunity. *Biomedical Journal* 44, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.10.001>.

Narni-Mancinelli, E., Chaix, J., Fenis, A., Kerdiles, Y.M., Yessaad, N., Reynders, A., Gregoire, C., Luche, H., Ugolini, S., Tomasello, E., et al. (2011). Fate mapping analysis of lymphoid cells expressing the NKp46 cell surface receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 18324–18329. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112064108>.

Nausch, N., and Mutapi, F. (2018). Group 2 ILCs: A way of enhancing immune protection against human helminths? *Parasite Immunol* 40, e12450. <https://doi.org/10.1111/pim.12450>.

Neill, D.R., and Flynn, R.J. (2018). Origins and evolution of innate lymphoid cells: Wardens of barrier immunity. *Parasite Immunol* 40, e12436. <https://doi.org/10.1111/pim.12436>.

Neill, D.R., Wong, S.H., Bellosi, A., Flynn, R.J., Daly, M., Langford, T.K.A., Bucks, C., Kane, C.M., Fallon, P.G., Pannell, R., et al. (2010). Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* 464, 1367–1370. <https://doi.org/10.1038/nature08900>.

Nussbaum, J.C., Van Dyken, S.J., von Moltke, J., Cheng, L.E., Mohapatra, A., Molofsky, A.B., Thornton, E.E., Krummel, M.F., Chawla, A., Liang, H.-E., et al. (2013). Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis. *Nature* 502, 245–248. <https://doi.org/10.1038/nature12526>.

O

Orimo, K., Saito, H., Matsumoto, K., and Morita, H. (2020). Innate Lymphoid Cells in the Airways: Their Functions and Regulators. *Allergy Asthma Immunol Res* 12, 381. <https://doi.org/10.4168/aaair.2020.12.3.381>.

Ouyang, W., Ranganath, S.H., Weindel, K., Bhattacharya, D., Murphy, T.L., Sha, W.C., and Murphy, K.M. (1998). Inhibition of Th1 Development Mediated by GATA-3 through an IL-4-Independent Mechanism. *Immunity* 9, 745–755. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80671-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80671-8).

Overbergh, L., Vig, S., Coun, F., and Mathieu, C. (2017). Quantitative Polymerase Chain Reaction. In *Molecular Diagnostics*, (Elsevier), pp. 41–58.

van de Pavert, S.A., Ferreira, M., Domingues, R.G., Ribeiro, H., Molenaar, R., Moreira-Santos, L., Almeida, F.F., Ibiza, S., Barbosa, I., Goverse, G., et al. (2014). Maternal retinoids control type 3 innate lymphoid cells and set the offspring immunity. *Nature* 508, 123–127. <https://doi.org/10.1038/nature13158>.

P

Pelly, V.S., Kannan, Y., Coomes, S.M., Entwistle, L.J., Rückerl, D., Seddon, B., MacDonald, A.S., McKenzie, A., and Wilson, M.S. (2016). IL-4-producing ILC2s are required for the differentiation of TH2 cells following *Heligmosomoides polygyrus* infection. *Mucosal Immunol* 9, 1407–1417. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.4>.

Powledge, T.M. (2004). The polymerase chain reaction. *Advances in Physiology Education* 28, 44–50. <https://doi.org/10.1152/advan.00002.2004>.

R

Rao, T.N., Kumar, S., Pulikkottil, A.J., Oliveri, F., Hendriks, R.W., Beckel, F., and Fehling, H.J. (2020). Novel, Non-Gene-Destructive Knock-In Reporter Mice Refute the Concept of Monoallelic *Gata3* Expression. *J.I.* 204, 2600–2611. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000025>.

Rauber, S., Lubber, M., Weber, S., Maul, L., Soare, A., Wohlfahrt, T., Lin, N.-Y., Dietel, K., Bozec, A., Herrmann, M., et al. (2017). Resolution of inflammation by interleukin-9-producing type 2 innate lymphoid cells. *Nat Med* 23, 938–944. <https://doi.org/10.1038/nm.4373>.

Rickard, M.D., and Williams, J.F. (1982). Hydatidosis/Cysticercosis: Immune Mechanisms and Immunization Against Infection. In *Advances in Parasitology*, (Elsevier), pp. 229–296.

S

Salimi, M., Barlow, J.L., Saunders, S.P., Xue, L., Gutowska-Owsiak, D., Wang, X., Huang, L.-C., Johnson, D., Scanlon, S.T., McKenzie, A.N.J., et al. (2013). A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *Journal of Experimental Medicine* 210, 2939–2950. <https://doi.org/10.1084/jem.20130351>.

Samson, S.I., Richard, O., Tavian, M., Ranson, T., Vosshenrich, C.A., Colucci, F., Buer, J., Grosveld, F., Godin, I., and Di Santo, J.P. (2003). GATA-3 Promotes Maturation, IFN- γ Production, and Liver-Specific Homing of NK Cells. *Immunity* 19, 701–711. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00294-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00294-2).

Sanos, S.L., Bui, V.L., Mortha, A., Oberle, K., Heners, C., Johner, C., and Diefenbach, A. (2009). ROR γ t and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells. *Nat Immunol* 10, 83–91. <https://doi.org/10.1038/ni.1684>.

Satoh-Takayama, N., Vosshenrich, C.A.J., Lesjean-Pottier, S., Sawa, S., Lochner, M., Rattis, F., Mention, J.-J., Thiam, K., Cerf-Bensussan, N., Mandelboim, O., et al. (2008). Microbial

Flora Drives Interleukin 22 Production in Intestinal NKp46+ Cells that Provide Innate Mucosal Immune Defense. *Immunity* 29, 958–970. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.11.001>.

Schlenner, S.M., Madan, V., Busch, K., Tietz, A., Läuble, C., Costa, C., Blum, C., Fehling, H.J., and Rodewald, H.-R. (2010). Fate Mapping Reveals Separate Origins of T Cells and Myeloid Lineages in the Thymus. *Immunity* 32, 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.03.005>.

Schulthess, J., Meresse, B., Ramiro-Puig, E., Montcuquet, N., Darche, S., Bègue, B., Ruemmele, F., Combadière, C., Di Santo, J.P., Buzoni-Gatel, D., et al. (2012). Interleukin-15-Dependent NKp46+ Innate Lymphoid Cells Control Intestinal Inflammation by Recruiting Inflammatory Monocytes. *Immunity* 37, 108–121. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.05.013>.

Sécca, C., Bando, J.K., Fachi, J.L., Gilfillan, S., Peng, V., Di Luccia, B., Cella, M., McDonald, K.G., Newberry, R.D., and Colonna, M. (2021). Spatial distribution of LTI-like cells in intestinal mucosa regulates type 3 innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 118, e2101668118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2101668118>.

Seemayer, T.A. (1990). Polymerase Chain Reaction. *Pediatric Pathology* 10, 311–317. <https://doi.org/10.3109/15513819009067120>.

Serafini, N., Klein Wolterink, R.G.J., Satoh-Takayama, N., Xu, W., Vosshenrich, C.A.J., Hendriks, R.W., and Di Santo, J.P. (2014). Gata3 drives development of RORγt+ group 3 innate lymphoid cells. *Journal of Experimental Medicine* 211, 199–208. <https://doi.org/10.1084/jem.20131038>.

Shah, N.J. (2019). Polymerase Chain Reaction. In *Introduction to Basics of Pharmacology and Toxicology*, G.M. Raj, and R. Raveendran, eds. (Singapore: Springer Singapore), pp. 395–397.

Shinnakasu, R., Yamashita, M., Shinoda, K., Endo, Y., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Ikemizu, S., and Nakayama, T. (2006). Critical YxKxHxxxRP Motif in the C-Terminal Region of GATA3 for Its DNA Binding and Function. *J Immunol* 177, 5801–5810. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.9.5801>.

Sonnenberg, G.F., Monticelli, L.A., Alenghat, T., Fung, T.C., Hutnick, N.A., Kunisawa, J., Shibata, N., Grunberg, S., Sinha, R., Zahm, A.M., et al. (2012). Innate Lymphoid Cells Promote Anatomical Containment of Lymphoid-Resident Commensal Bacteria. *Science* 336, 1321–1325. <https://doi.org/10.1126/science.1222551>.

Spits, H., and Cupedo, T. (2012). Innate Lymphoid Cells: Emerging Insights in Development, Lineage Relationships, and Function. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 647–675. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075053>.

Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., et al. (2013a). Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol* 13, 145–149. <https://doi.org/10.1038/nri3365>.

Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., et al. (2013b). Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol* 13, 145–149. <https://doi.org/10.1038/nri3365>.

Spooner, C.J., Lesch, J., Yan, D., Khan, A.A., Abbas, A., Ramirez-Carrozzi, V., Zhou, M., Soriano, R., Eastham-Anderson, J., Diehl, L., et al. (2013). Specification of type 2 innate lymphocytes by the transcriptional determinant Gfi1. *Nat Immunol* 14, 1229–1236. <https://doi.org/10.1038/ni.2743>.

T

Takatori, H., Kanno, Y., Watford, W.T., Tato, C.M., Weiss, G., Ivanov, I.I., Littman, D.R., and O’Shea, J.J. (2009). Lymphoid tissue inducer–like cells are an innate source of IL-17 and IL-22. *Journal of Experimental Medicine* 206, 35–41. <https://doi.org/10.1084/jem.20072713>.

Tanaka, S., Motomura, Y., Suzuki, Y., Yagi, R., Inoue, H., Miyatake, S., and Kubo, M. (2011). The enhancer HS2 critically regulates GATA-3-mediated Il4 transcription in TH2 cells. *Nat Immunol* 12, 77–85. <https://doi.org/10.1038/ni.1966>.

Tindemans, I., Serafini, N., Di Santo, J.P., and Hendriks, R.W. (2014). GATA-3 Function in Innate and Adaptive Immunity. *Immunity* 41, 191–206. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.006>.

Turner, J.-E., Morrison, P.J., Wilhelm, C., Wilson, M., Ahlfors, H., Renauld, J.-C., Panzer, U., Helmbj, H., and Stockinger, B. (2013). IL-9–mediated survival of type 2 innate lymphoid cells promotes damage control in helminth-induced lung inflammation. *Journal of Experimental Medicine* 210, 2951–2965. <https://doi.org/10.1084/jem.20130071>.

U

Usui, T., Nishikomori, R., Kitani, A., and Strober, W. (2003). GATA-3 Suppresses Th1 Development by Downregulation of Stat4 and Not through Effects on IL-12R β 2 Chain or T-bet. *Immunity* 18, 415–428. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00057-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00057-8).

V

Vosshenrich, C.A., and Di Santo, J.P. (2013). Developmental programming of natural killer and innate lymphoid cells. *Current Opinion in Immunology* 25, 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.02.002>.

Vosshenrich, C.A.J., García-Ojeda, M.E., Samson-Villéger, S.I., Pasqualetto, V., Enault, L., Goff, O.R.-L., Corcuff, E., Guy-Grand, D., Rocha, B., Cumano, A., et al. (2006). A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127. *Nat Immunol* 7, 1217–1224. <https://doi.org/10.1038/ni1395>.

W

Wan, Y.Y. (2014a). GATA3: a master of many trades in immune regulation. *Trends in Immunology* 35, 233–242. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.04.002>.

Wan, Y.Y. (2014b). GATA3: a master of many trades in immune regulation. *Trends in Immunology* 35, 233–242. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.04.002>.

Waters, D.L.E., and Shapter, F.M. (2014). The Polymerase Chain Reaction (PCR): General Methods. In *Cereal Genomics*, R.J. Henry, and A. Furtado, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 65–75.

Wei, G., Abraham, B.J., Yagi, R., Jothi, R., Cui, K., Sharma, S., Narlikar, L., Northrup, D.L., Tang, Q., Paul, W.E., et al. (2011). Genome-wide Analyses of Transcription Factor GATA3-

Chapitre 5. Bibliographie

Mediated Gene Regulation in Distinct T Cell Types. *Immunity* 35, 299–311. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.08.007>.

Welch, H.M. (2012). The Polymerase Chain Reaction. In *Metastasis Research Protocols*, M. Dwek, S.A. Brooks, and U. Schumacher, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 71–88.

Wikel, S.K. (1984). Immunomodulation of host responses to ectoparasite infestation – an overview. *Veterinary Parasitology* 14, 321–339. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(84\)90099-2](https://doi.org/10.1016/0304-4017(84)90099-2).

Withers, D.R. (2011). Lymphoid tissue inducer cells. *Current Biology* 21, R381–R382. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.03.022>.

Wong, S.H., Walker, J.A., Jolin, H.E., Drynan, L.F., Hams, E., Camelo, A., Barlow, J.L., Neill, D.R., Panova, V., Koch, U., et al. (2012). Transcription factor ROR α is critical for nuocyte development. *Nat Immunol* 13, 229–236. <https://doi.org/10.1038/ni.2208>.

Y

Yagi, R., Junttila, I.S., Wei, G., Urban, J.F., Zhao, K., Paul, W.E., and Zhu, J. (2010). The Transcription Factor GATA3 Actively Represses RUNX3 Protein-Regulated Production of Interferon- γ . *Immunity* 32, 507–517. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.04.004>.

Yagi, R., Zhu, J., and Paul, W.E. (2011). An updated view on transcription factor GATA3-mediated regulation of Th1 and Th2 cell differentiation. *International Immunology* 23, 415–420. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxr029>.

Yagi, R., Zhong, C., Northrup, D.L., Yu, F., Bouladoux, N., Spencer, S., Hu, G., Barron, L., Sharma, S., Nakayama, T., et al. (2014). The Transcription Factor GATA3 Is Critical for the Development of All IL-7R α -Expressing Innate Lymphoid Cells. *Immunity* 40, 378–388. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.01.012>.

Yang, Q., Li, F., Harly, C., Xing, S., Ye, L., Xia, X., Wang, H., Wang, X., Yu, S., Zhou, X., et al. (2015). TCF-1 upregulation identifies early innate lymphoid progenitors in the bone marrow. *Nat Immunol* 16, 1044–1050. <https://doi.org/10.1038/ni.3248>.

Yang, Z., Wang, H., Zhang, N., Xing, T., Zhang, W., Wang, G., Li, C., and Yu, C. (2020). Chaetocin Abrogates the Self-Renewal of Bladder Cancer Stem Cells via the Suppression of the KMT1A–GATA3–STAT3 Circuit. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 424. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00424>.

Z

Zeng, B., Shi, S., Ashworth, G., Dong, C., Liu, J., and Xing, F. (2019). ILC3 function as a double-edged sword in inflammatory bowel diseases. *Cell Death Dis* 10, 315. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1540-2>.

Zhu, Y., Wang, Y., Xia, C., Li, D., Li, Y., Zeng, W., Yuan, W., Liu, H., Zhu, C., Wu, X., et al. (2004). WDR26: a novel Gbeta-like protein, suppresses MAPK signaling pathway. *J Cell Biochem* 93, 579–587. <https://doi.org/10.1002/jcb.20175>.

(2008). PCR Primers. In *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*, (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 63–90.

Résumé

Introduction : Les cellules lymphoïdes innées (ILCs) sont des cellules qui jouent un rôle très important dans la défense contre les infections, notamment les infections parasitaires. Ces cellules se caractérisent par l'expression d'une large batterie de facteurs de transcription et la production d'une variété de cytokines impliquées dans les réponses anti-infectieuses et anti-inflammatoires. Le facteur de transcription GATA3 est un facteur clé qui permet la régulation de la différenciation et le maintien des ILC2s.

Objectif : L'élaboration des séquences d'oligonucléotides qui serviront d'amorces à l'amplification de l'exon 1 du gène GATA3 par PCR.

Matériel et méthodes : afin de concevoir des amorces spécifiques du gène GATA3, nous avons utilisé des outils de bio-informatique. La base de données www.ensembl.org a été utilisée pour rechercher des séquences spécifiques du gène GATA3 et l'outil Primer-BLAST fourni par NCBI a été utilisé pour concevoir des amorces. Les résultats ont été confirmés par PCR *in silico*.

Résultats : L'utilisation de L'outil Primer-BLAST a permis d'obtenir une amorce spécifique au gène GATA3 à savoir : Forward primer «GCTGTTTCTCCCTCCC», Réverse primer «CCACACTCACACACCGTA» avec un produit spécifique de 499 Pb, Tm (Forward primer 60,03°C, Reverse primer : 59,90°C), la teneur en GC est de 60% Pour l'amorce sens et 55% pour l'anti-sens et une longueur de 20 nucléotides pour les deux amorces.

Conclusion : Concevoir une bonne paire d'amorces aide à réussir la technique PCR, et donc l'amplification correcte du gène GATA3 et l'étude de son rôle au cours des infections parasitaires.

Mots clé : amorces, GATA3, ILC2, parasites, Primer-BLAST,

Abstract

Introduction: Innate lymphoid cells (ILCs) are cells that play a very important role in the defense against infections, especially parasitic infections. These cells are characterized by the expression of a large battery of transcription factors and the production of a variety of cytokines involved in anti-infectious and anti-inflammatory responses. The transcription factor GATA3 is a key factor that regulates the differentiation and maintenance of ILC2s.

Objective: Development of oligonucleotide sequences to be used as primers for the amplification of the exon 1 of GATA3 gene by PCR.

Materials and methods: In order to design primers specific to the GATA3 gene, we used bioinformatics tools. The database www.ensembl.org was used to search for specific sequences of the GATA3 gene and the Primer-BLAST tool provided by NCBI was used to design primers. The results were confirmed by *in silico* PCR.

Results: The use of the Primer-BLAST tool allowed us to obtain a specific primer for the GATA3 gene: Forward primer «GCTGTTTCTCCCTCCC», Reverse primer «CCACACTCACACACCGTA» with a specific product of 499 Pb, Tm (Forward primer 60,03°C, Reverse primer : 59,90°C), the GC content is 60% for the sense primer and 55% for the anti-sense primer and a length of 20 nucleotides for both primers.

Conclusions: Designing a good primer pair helps the PCR technique succeed, and thus the correct amplification of the GATA3 gene and the study of its role during parasitic infections.

Keywords: GATA3, ILC2, parasites, Primer-BLAST, primers.

المخلص

مقدمة: الخلايا اللمفاوية الفطرية (ILC2s) هي الخلايا التي تلعب دورًا مهمًا جدًا في الدفاع ضد الالتهابات، وخاصة الالتهابات الطفيلية. تتميز هذه الخلايا بالتعبير عن مجموعة كبيرة من عوامل النسخ وإنتاج مجموعة متنوعة من السيتوكينات المشاركة في الاستجابات المضادة للعدوى والمضادة للالتهابات. عامل النسخ GATA3 هو عامل رئيسي ينظم تمايز وصيانة (ILC2s).

الهدف: تطوير تسلسل قليل النوكليوتيد لاستخدامه كأساس لتضخيم جين GATA3 بواسطة تفاعل البوليميراز المتسلسل.

المواد والطرق: من أجل تصميم بادئات خاصة بجين GATA3 استخدمنا أدوات المعلوماتية الحيوية. قاعدة البيانات. تم استخدام www.ensembl.org للبحث عن تسلسلات محددة من جين GATA3 واستخدمت أداة Primer-BLAST التي يوفرها NCBI لتصميم البادئات. تم تأكيد النتائج في PCR *in silico*.

النتائج: سمح لنا استخدام أداة Primer-BLAST بالحصول على أساس محدد لجين GATA3: التمهيدي الأمامي «GCTGTTTCTCCCTCCC»، التمهيدي العكسي «CCACACTCACACACCGTA» مع منتج محدد من 499 Pb، Tm (التمهيدي الأمامي 60.03 درجة مئوية، التمهيدي العكسي: 59.90 درجة مئوية)، محتوى GC هو 60% للبادئ الحس و55% للبادئ المضاد للحس وطول 20 نوكليوتيد لكل البادئين.

الاستنتاجات: تصميم زوج تمهيدي جيد يساعد على نجاح تقنية PCR، وبالتالي التضخيم الصحيح لجين GATA3 ودراسة دوره أثناء العدوى الطفيلية. **الكلمات المفتاحية:** GATA3، ILC2، طفيليات، برايمر بلاست، مواد أولية.