



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique  
UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID-TLEMEN



Faculté de Science de la Nature et de la Vie et Science de la Terre et l'Univers

**Département de Biologie**

Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliqué et de l'Immunologie W04144100

**MEMOIRE**

Présenté par

BENABBOU Ilhem

En vue de l'option du

**Diplôme de MASTER**

En Immunologie

**Thème :**

Conception des amorces du gène IL-17A exprimé par les cellules lymphoïdes innées de type3 (ILCs3) et son rôle lors de l'infection par *Pseudomonas aeruginosa*

Soutenu le 24 Juin 2024, devant le jury composé de :

Présidente	ZERHOUNI Khadjidja	MAB	Université de Tlemcen
Encadrante	NOUARI Wafa	MCB	Université de Tlemcen
Examinatrice	MILIANI Maroua	MCB	Université de Tlemcen

**Année Universitaire 2023/2024**

## Résumé

**Introduction :** Les cellules lymphoïdes innées (ILC, *Innate lymphoïde cells*) sont des cellules qui font partie de la première ligne de défense contre les infections notamment les infections bactériennes. Ces cellules présentent une grande diversité de facteurs de transcription et produisent une gamme de cytokines impliquées dans certaines réponses immunitaires anti-inflammatoires et anti-infectieuses. L'IL-17 est une cytokine pro-inflammatoire produites principalement par les ILC3s et joue un rôle important dans les défenses contre les infections bactériennes.

**Objectif :** concevoir des séquences d'oligonucléotides qui serviront d'amorces pour amplifier le gène *IL-17A* par PCR.

**Matériel et méthodes :** nous avons utilisé la bio-informatique pour élaborer des amorces spécifiques du gène *IL-17A*. La séquence du gène *IL-17A* a été obtenue grâce à la base de données « Ensembl », tandis que les amorces ont été conçues à l'aide de l'outil « Primer-BLAST » du site NCBI. Les résultats ont été confirmés par PCR *in silico*.

**Résultats :** plusieurs paires d'amorces spécifiques présentent des caractéristiques optimales pour le bon déroulement d'une PCR ont été choisies.

**Conclusion :** La conception de bonnes d'amorces permet de réussir la technique PCR et par la suite amplifier le gène *IL-17A* et étudier son rôle lors de l'infection par *P. aeruginosa*.

**Mots clé :** ILC3, *IL-17A*, *P. aeruginosa*, Primer-BLAST, amorces.

## **Abstract**

**Introduction:** Innate lymphoid cells (ILC) are cells that are part of the first line of defence against infections, particularly bacterial infections. These cells display a wide diversity of transcription factors and produce a range of cytokines involved in certain anti-inflammatory and anti-infectious immune responses. IL-17 is a pro-inflammatory cytokine produced mainly by ILC3s and plays an important role in defences against bacterial infections.

**Objective:** design oligonucleotide sequences that will serve as primers to amplify the *IL-17A* gene by PCR.

**Material and methods:** we used bioinformatics to develop specific primers for the *IL-17A* gene. The *IL-17A* gene sequence was obtained using the “Ensembl” database, while the primers were designed using the “Primer-BLAST” tool on the NCBI website. The results were confirmed by *in silico* PCR.

**Results:** several pairs of specific primers presenting optimal characteristics for the smooth running of a PCR were chosen.

**Conclusion:** The design of good primers allows the PCR technique to be successful and subsequently to amplify the *IL-17A* gene and study its role during *P. aeruginosa* infection.

Key words: ILC3, *IL-17A*, *P. aeruginosa*, Primer-BLAST, primers.

## ملخص

**مقدمة:** الخلايا اللمفاوية الفطرية (ILC) هي الخلايا التي تشكل جزءًا من خط الدفاع الأول ضد الالتهابات، وخاصة الالتهابات البكتيرية. تعرض هذه الخلايا مجموعة واسعة من عوامل النسخ وتنتج مجموعة من السيتوكينات المشاركة في بعض الاستجابات المناعية المضادة للالتهابات والمضادة للعدوى IL-17. هو سيتوكين مؤيد للالتهابات يتم إنتاجه بشكل رئيسي بواسطة ILC3s ويلعب دورًا مهمًا في الدفاعات ضد الالتهابات البكتيرية.

**الهدف:** تصميم تسلسلات قليل النوكليوتيد التي ستكون بمثابة بادئات لتضخيم جين IL-17A بواسطة PCR.

**المواد والطرق:** استخدمنا أدوات المعلوماتية الحيوية لتطوير بادئات محددة لجين IL-17A. تم الحصول على تسلسل الجينات IL-17A باستخدام قاعدة بيانات "Ensembl"، في حين تم تصميم الاشعال باستخدام أداة "Primer-BLAST" على موقع NCBI. تم تأكيد النتائج بواسطة silico PCR.

**النتائج:** تم اختيار عدة أزواج من البادئات المحددة التي تقدم الخصائص المثلى للتشغيل السلس لـ PCR.

**الخلاصة:** إن تصميم البادئات الجيدة يسمح لتقنية PCR بالنجاح ومن ثم تضخيم جين IL-17A ودراسة دوره أثناء الإصابة بـ *P. aeruginosa*.

**الكلمات المفتاحية:** ILC3، IL-17A، *P. aeruginosa*، Primer-BLAST، بادئات.

**Avant-propos**

Tout d'abord, le grand merci est pour **ALLAH** qui nous donne la capacité suffisante et la patience pour réaliser ce modeste travail.

J'adresse mes sincères remerciements à mon encadrante Dr. Wafa NOUARI, maître de conférences de classe B au département de Biologie- Université de Tlemcen, d'avoir dirigée mes travaux et m'avoir apportée une aide précieuse en ces moments difficiles par ses précieux conseils et ses orientations. J'ai été extrêmement chanceuse pour sa disponibilité, ses encouragements, et surtout sa gentillesse.

Je tiens à remercier les membres du jury, d'avoir accepté de consacrer leur précieux temps d'évaluer ce travail.

Je remercie également tous mes enseignants pour leurs soutiens et leurs conseils durant mon cursus universitaires.

Finalement, Je tiens à remercier tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou loin pour terminer ce travail

***Je dédie ce travail à mes très chers parents, qui sont  
mon symbole de force et de Courage  
A ma très chère mère, qui m'ont soutenu et abreuvé tout  
au long de ma vie tendresse et amour  
A mon idole dans la vie, mon père  
Ma petite sœur Mimi et mes frères Younes, Yacine, Ayoub  
Je les remercie pour tout le soutien et l'amour qu'ils me  
portent et qu'ALLAH les garde pour moi.***

## Abréviations

---

### A

ADN : ADN : acide désoxyribonucléique

ADPRT : Adénosine diphosphate ribosyl transférase

AMPc : adenosine 3', 5' monophosphate cyclique

APC : cellules présentatrices d'antigène

AREG : l'amphireguline

ARNm : *Acide ribonucléique messenger*

### C

C° : Celsius

C : Cytosine

CSH: cellule souche hématopoïétique

CMP : précurseur myéloïde commun

CLP : précurseur lymphoïde commun

CILP : common innate lymphoid progenitor

CHILP : common helper innate lymphoid Progenitor

cDC :cellules dendritiques conventionnelles

CC20 : CC chemokine ligand

CD127 : cluster of differentiation

CXCR6: *motif chemokine receptor 6*

### 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

GM-CSF : *Granulocyte Macrophage colony-stimulating factor*

### I

ILCs : cellules lymphoïdes innées

ILCP : cellule lymphoïde innée précurseur

iILC : ILC intra-épithéliale

IL : Interleukine

IFN : Interféron

iNOS : inductible nitric oxide synthase

IgA : Immunoglobuline A

Id2: inhibiteur de la liaison à l'ADN2

### L

LTi: inducteurs des tissus lymphoïdes

LPS : Lipopolysaccharide

### M

Mg 2+ : Magnésium

### N

NCBI : National Center for Biotechnology Information

NK : Natural killer

NKP : progéniteurs NK

NFIL3 : facteur nucléaire interleukine 3-Régulée

NF-κB : Facteur nucléaire kappa B (*Nuclear factor-kappa B*)

Nt : Nucléotide

### P

PLZF : promyelocytic leukaemia zinc finger

PCR : Polymerase chain reaction

PLA 2 : phospholipase A<sub>2</sub>

PLP :précurseurs lymphoïdes communs

### R

RORγt : Récepteur gamma orphelin lié aux récepteurs de l'acide rétinoïque

STAT : Transducteur de signal et activateur de transcription

### T

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

TLR5 : *Toll-like recepteur*

TCF : *T cell factor*

### Table des matières

<b>Résumé</b>	<b>III</b>
<b>Abstract</b>	<b>IV</b>
<b>Résumé en Arabe</b>	<b>V</b>
<b>Avant-propos</b>	<b>VI</b>
<b>Table des matières</b>	<b>VII</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>X</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>XI</b>
<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1. Revue de la littérature</b>	<b>2</b>
<b>1. 1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	<b>2</b>
1.1.1. Caractéristiques de <i>P. aeruginosa</i>	2
1.1.2. Habitat de <i>P. aeruginosa</i>	3
1.1.3. Facteur de pathogénicité de <i>P. aeruginosa</i>	3
1.1.3.1. Facteurs associés à la bactérie	4
1.1.3.1.1. Pili ou fimbriae	4
1.1.3.1. 2. Flagelle	4
1.1.3.1. 3. Lipopolysaccharide (LPS)	4
1.1.3.1.5. Biofilm	5
1.1.3.2. Facteurs sécrétés	6
1.1.3.2.1. Exotoxine A	6
1.1.3.2.2. Toxines	6
1.1.3.2.3. Protéase	7
1.1.3.2.4. Pyocyanin	7
1.1.3.2.5. Lipase A	7
1.1.3.2.6. Phospholipase C	7

## Table des matières

---

1.1.4. Aspect épidémiologique	8
1.1.5. Résistance de <i>P. aeruginosa</i>	8
<b>1.2. Les cellules lymphoïdes innées</b>	<b>10</b>
1.2.1. Historique	10
1.2.2. Développement	10
1.2.3. Sous populations	12
1.2.3.1. ILC de type 1	12
1.2.3.1. A. Les cellules cNK	13
1.2.3.1. B. ILC1 intra-épi-théliale	13
1.2.3.2. ILC de type 2	13
1.2.3.3. ILC de type 3	13
1.2.4. Plasticité	14
1.2.5. Fonctions des ILCs et cytokines produites	16
ILC1s	16
ILC2s	16
ILC3s	17
<b>1.3. IL-17</b>	<b>18</b>
1.3.1. Généralités	18
1.3.2. Membres de famille	18
1.3.3. Récepteur d'IL-17 et signalisation	18
1.3.4. Localisation et structure du gène <i>IL17A</i>	20
1.3.5. Fonctions d'IL-17A	21
<b>1.4. PCR</b>	<b>23</b>
1.4.1. Définition	23
1.4.2. Principe de la PCR	23
1.4.3. Les composants de la PCR	23

## Table des matières

---

1.4.3.1. L'ADN	23
1.4.3.2. Les amorces	23
1.4.3.3. Les nucléotides	24
1.4.3.4. L'enzyme, Taq polymérase	24
1.4.3.5. Ions de Mg 2+	25
1.4.3.6. Le thermocycleur	25
1.4.4. Etapes de la PCR	25
1.4.4.1. La dénaturation	25
1.4.4.2. L'hybridation	25
1.4.4.3. L'élongation	26
<b>1.5. Problématique et objectif</b>	<b>28</b>
1.5.1. Problématique	28
1.5.2. Objectif	28
1.5.3. But	28
<b>Chapitre 2. Matériels et méthodes</b>	<b>29</b>
<b>2.1. Conception des amorces</b>	<b>29</b>
2.2. Conception des amorces pour amplifier le gène <i>IL17A</i>	30
2.2.1. Détermination de la séquence du gène <i>IL17A</i>	30
2.2.2. Le design des Primers : L'outil Primer-BLAST	32
2.2.3. Confirmation des résultats par In-Silico PCR	35
<b>Chapitre 3. Résultats</b>	<b>36</b>
3.1. Résultats de la conception des amorces	36
3.1.1. Résultats du Primer-BLAST	36
3.1.2. Résultats d'In-silico PCR	38
<b>Chapitre 4. Conclusions et perspectives</b>	<b>40</b>
<b>Chapitre 5. Bibliographie</b>	

### LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.1.</b> Structure du LPS	5
<b>Figure 1.2.</b> Les étapes de la formation de biofilm chez <i>P. aeruginosa</i>	6
<b>Figure 1.3.</b> Développement des cellules lymphoïdes innées	12
<b>Figure 1.4.</b> Sous-types de cellules lymphoïdes innées (ILCs)	14
<b>Figure 1.5.</b> Plasticité des ILCs	16
<b>Figure 1.6.</b> Voie de signalisation d'interleukine d'IL-17A	20
<b>Figure 1.7.</b> Localisation du gène <i>IL-17A</i> sur le chromosome 6 humain	20
<b>Figure 1.8.</b> Effet biologique d'IL17	22
<b>Figure 1.9.</b> Présentation schématique du principe de la PCR	27
<b>Figure 2.1.</b> Plateforme de la base de données Ensembl	30
<b>Figure 2.2.</b> Résultats de la recherche du gène <i>IL17A</i>	31
<b>Figure 2.3.</b> Les caractéristiques du gène <i>IL17A</i>	31
<b>Figure 2.4.</b> La séquence du gène <i>IL17A</i> par la plateforme Ensembl	32
<b>Figure 2.5.</b> La séquence de l'exon 1 du gène <i>IL17A</i>	32
<b>Figure 2.6.</b> Le site NCBI	33
<b>Figure 2.7.</b> L'outil Primer-BLAST	33
<b>Figure 2.8.</b> L'outil Primer-BLAST	34
<b>Figure 2.9.</b> Paramètres de vérification de la spécificité des paires d'amorces (Primer Pair Specificity Checking Parameters)	34
<b>Figure 2.10.</b> Plateforme du site « genome.ucsc.edu »	35
<b>Figure 2.11.</b> Le site <i>In-Silico</i> PCR	35
<b>Figure 3.1.</b> Résultats du Primer-BLAST	36
<b>Figure 3.2.</b> Primer pair 1	36
<b>Figure 3.3.</b> Primer pair 2	36
<b>Figure 3.4.</b> Primer pair 3	37

## **LISTE DES FIGURES**

---

<b>Figure 3.5.</b> Primer pair 4	37
<b>Figure 3.6.</b> Primer pair 5	37
<b>Figure 3.7.</b> Résultats du Primer-BLAST	38
<b>Figure 3.8.</b> Les amorces encadrant la région d'intérêt	38
<b>Figure 3.9.</b> Confirmation des résultats sur la plateforme « UCSC genome browser »	39
<b>Figure 3.10.</b> Résultats de la confirmation	39

### Liste des tableaux

**Tableau 1.1.** Facteurs de pathogénicité de *P. aeruginosa* 8

**Tableau 3.1.** La comparaison entre les critères d'une bonne amorce et nos amorces 37

## Introduction

### Introduction

*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) est un pathogène à Gram négatif opportuniste multirésistante qui provoque des infections aiguës ou chroniques chez les patients immunodéprimés (Qin et al. 2022). Cette bactérie possède divers facteurs de virulence responsables à sa pathogénèse et de son échappement aux réponses immunitaires (Ben Haj Khalifa et al. 2011).

Les cellules lymphoïdes innées (ILC) (*Innate lymphoïde cells*) font partie de la première ligne de défense contre les infections (Van De Pavert et Vivier 2016). Ces cellules sont identifiées dans de nombreux organes, tels que le sang, les amygdales, le thymus, le foie, l'intestin, les poumons, la peau, l'utérus et la moelle osseuse et particulièrement abondantes dans les tissus muqueux. Elles caractérisent par l'absence de récepteurs antigéniques (Forkel et Mjösberg 2016). En fonction de l'expression des facteurs de transcription et des cytokines qu'elles sécrètent, ces cellules se divisent en 3 sous-populations: ILC1s, ILC2s et ILC3s (Simoni et Newell 2018). Les ILC du groupe 1 dépendent du facteur de transcription T-box expressed-in-T (T-bet) et produisent de l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ) en réponse à la stimulation de l'IL-12 et de l'IL-18. Les ILC2 sécrètent des cytokines de type 2, telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-13 en réponse à l'IL-33, l'IL-25 et la lymphopoiétine stromale thymique (TSLP) et nécessitent les facteurs de transcription GATA binding protein 3 (GATA3) et related orphan receptor (ROR) pour leur développement (Konya et Mjösberg 2015). Enfin, les ILCs du groupe 3 se ressemblent aux cellules Th17/Th 22 par leur sécrétion de l'interleukine-17 (IL-17) et l'IL-22 et se caractérisent par l'expression du facteur de transcription ROR $\gamma$ t (*RAR-related orphan receptor gamma t*) (Van De Pavert et Vivier 2016). L'IL-17 est une cytokine pro-inflammatoire qui comprend six membres (A-F) et produites par différentes cellules principalement les ILC3s. Plusieurs études ont montré que le gène *IL-17A* qui code pour cette cytokine est fortement exprimé par ces cellules dans les défenses aiguës contre les infections bactériennes (Valeri et Raffatellu 2016).

A ce propos, ce travail consiste à élaborer des amorces qui serviront à amplifier la séquence d'oligonucléotide par PCR contenant le gène *IL-17A* exprimé par les ILC3S qui contribue à la lutte contre les infections bactériennes.

## Chapitre 1. Revue de la littérature

### Chapitre 1. Revue de littérature

#### 1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

La découverte de *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) remonte à l'année 1850 où Sédillot a remarqué pour la première fois que la décoloration des pansements chirurgicaux a été associée à un agent transmissible. En 1860, Fordos a extrait le pigment responsable de la coloration bleue et en 1862 Lucke a associé ce pigment à des organismes en forme de bâton. Entre 1889 et 1894 a décrit que *P. aeruginosa* est l'agent responsable de la coloration bleu-vert dans les plaies des patients (Lister, Wolter, et Hanson 2009). En 1894, Migula a décrit le genre *Pseudomonas* comme l'un des genres bactériens les plus diversifiés et présents dans les sédiments, les échantillons cliniques, les plantes et les champignons (Peix, Ramírez-Bahena, et Velázquez 2009). *P. aeruginosa* est un agent pathogène opportuniste à Gram négatif et une bactérie de référence pour étudier la virulence et les traits sociaux bactériens (Diggle et Whiteley 2020a).

##### 1.1.1. Caractéristiques

*P. aeruginosa* est un bâtonnet à Gram négatif, non sporulé, et non capsulé qui appartient à la famille des *Pseudomonadaceae*. Ce germe est capable de provoquer diverses infections notamment, les infections nosocomiales chez les hôtes immunocompétents et immunodéprimés (Reynolds et Kollef 2021a). L'infection à *P. aeruginosa* s'associe à la synthèse de plusieurs facteurs de virulence, tels que et l'élastase, l'exotoxine A, ainsi que de l'exopolysaccharide (Van Alst et al. 2009).

*P. aeruginosa*, ainsi appelé « bacille pyocyanique », est un bacille pigmenté de 1 à 3 µm de longueur et de 0,5 à 1 µm de largeur, producteur de cytochrome oxydase, mobile grâce à un flagelle polaire. Cette bactérie est ubiquitaire et comprend l'un des grandes et complexe génomes bactériens (Morand et Morand 2017). Sa température optimale de croissance 37°C, mais elle est capable de se développer dans des températures allant de +4°C à + 45°C (Diggle et Whiteley 2020b).

*P. aeruginosa* est une bactérie non fermentative et aérobie qui utilise la voie glycolytique pour la dégradation du glucose avec l'oxygène comme accepteur final d'électrons (De Sousa et al. 2021a). Ce germe est présent dans divers contextes environnementaux, et peut être issu de différentes sources vivantes notamment les plantes, les animaux et les humains (Lister, Wolter, et Hanson 2009). Ainsi, il se caractérise par sa capacité à survivre et à coloniser avec des besoins minimaux des nutriments et à supporter différentes conditions physiques. Il peut utiliser une variété de sources de carbone, d'azote et d'énergie (Lister, Wolter, et Hanson 2009). Cette bactérie est caractérisée par la formation de biofilms et par la production de colorants fluorescents et de sidérophore (Mielko et al. 2019).

## Chapitre 1. Revue de la littérature

via son Pili et son flagelle, elle attaque les cellules épithéliales respiratoires et utilise un système de sécrétion de type III pour augmenter sa virulence (Reynolds et Kollef 2021b). Les souches PAO1 et PA14 sont les souches les plus utilisées pour créer des ressources génomiques, et la souche PAO1 est l'origine du premier génome de *P. aeruginosa* séquencé. La taille du génome est de 6,3 Mbp (6,3 millions de paires de bases codant 5570 cadres de lecture) et code pour de multiples déterminants intrinsèques. De plus, ce génome représente une grande plasticité ce qui permet à *P. aeruginosa* de s'adapter et de se développer dans diverses conditions environnementales (Diggle et Whiteley 2020b).

*P. aeruginosa* présente une grande capacité à acquérir une résistance supplémentaire aux antibiotiques et une faible sensibilité aux plusieurs antibiotiques (Laborda, Martínez, et Hernando-Amado 2022). En générale, sa résistance antimicrobienne est acquise, soit par une mutation de gènes endogènes, où par acquisition de gènes de résistance exogène (Poole 2011).

*P. aeruginosa* peut former différents types de colonies :

- « *Large* » (L) : colonies bombées à contours irréguliers.
- « *Small colony variant* » (SCV) : petites colonies à bords réguliers, largement décrites durant les infections pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose (Malone 2015 ; Häußler 2004).
- Mucoïdes (M) : colonies bombées et visqueuses.

Les colonies peuvent être pigmentées et les pigments les plus courants sont la pyocyanine (Pigment bleu-vert, spécifique de l'espèce *P. aeruginosa*) et la pyoverdine (pigment jaune-vert fluorescent) (Ben Haj Khalifa et al. 2011).

### 1.1.2. Habitat

*P. aeruginosa* est un microorganisme ubiquitaire qui se trouve dans de très nombreux les milieux environnementaux, des milieux animale, végétale ou humain. Il peut être isolé de diverses sources médicales. Il vit en tant qu'organisme commensal et peut coloniser plusieurs organes et tissus de l'homme et de l'animal, notamment la peau, le tractus gastro-intestinal et le tractus respiratoire et urinaire (Lister, Wolter, et Hanson 2009).

### 1.1.3. Facteurs de pathogénicité

*P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste qui cause des infections pulmonaires mortelles. Ce potentiel d'infection découle en partie de la présence de facteurs de virulence associés à la cellule ou extracellulaires sécrétés par l'intermédiaire de systèmes de sécrétion et de sa capacité à métaboliser de nombreux antibiotiques (Laborda, Martínez, et Hernando-

## Chapitre 1. Revue de la littérature

Amado 2022). Ces facteurs de virulence sont nécessaires à sa pathogénèse et à son infection et jouent un rôle important dans la colonisation, la survie de la bactérie et l'invasion des tissus (Ben Haj Khalifa et al. 2011).

### 1.1.3.1. Facteurs de virulence associés à la bactérie

#### 1.1.3.1.1. Pili ou fimbriae

*P. aeruginosa* génère des pili polaires qui sont des filaments flexibles de plusieurs micromètres de longueur et composés d'une petite sous-unité. Les pili favorisent l'adhésion aux cellules phagocytaires (Mattick, Whitchurch, et Alm 1996) et aux épithéliums et participent à de nombreuses fonctions, notamment à la motilité, l'organisation de microcolonies, la régulation des facteurs de virulence et la résistance aux antibiotiques, la formation de biofilm et à l'absorption d'ADN (Liao et al. 2022a).

#### 1.1.3.1.2. Flagelle

Les flagelles sont des appendices filamenteux qui assurent la mobilité de la bactérie et la chimiotaxie et facilitent l'attachement et l'adhésion de la bactérie aux cellules épithéliales et la maturation de biofilm (Liao et al. 2022a). *P. aeruginosa* possède un seul flagelle composé d'un crochet proximal court dans la partie externe et d'un long filament hélice constitué de sous-unités de flagelline (Garcia et al. 2018). Via le récepteur *Toll-like 5* (TLR5), les flagelles peuvent déclencher l'activation de la réponse immunitaire de l'hôte et provoquent une réaction inflammatoire dépendante de la voie NF- $\kappa$ B (Liao et al. 2022a).

#### 1.1.3.1.3. Lipopolysaccharide

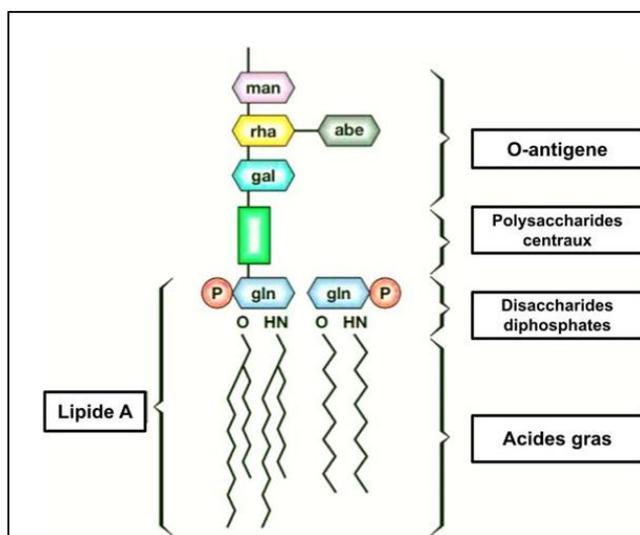
Le Lipopolysaccharide (LPS) est un élément constitutif important de la membrane externe (MO) de la majorité des bactéries à Gram négatif. Il contribue à l'intégrité de la structure de la bactérie et protège la membrane contre les attaques chimiques et augmente la charge négative de la membrane cellulaire (Qin et al. 2022a). De plus, il joue un rôle important dans les interactions du pathogène avec le système immunitaire inné.

Le LPS contient un fragment lipidique A, des oligosaccharides des noyaux interne et externe (le cœur oligosaccharidique) et un antigène O dans l'extrémité (figure 1.1) (Maldonado, Sá-Correia, et Valvano 2016). Il permet d'induire la production de cytokines pro-inflammatoires de manière dépendante du TLR4 (Qin et al. 2022a).

Le lipide A (endotoxine) est une région hydrophobe composée d'un disaccharide de glucosamine. Il forme une couche externe de la membrane externe et ces glucosamines donnent la caractéristique hexa-acylé des lipides A et qui rend ces lipides hautement immunogènes et aident les bactéries à résister aux antibiotiques, au système du complément et à d'autres stress environnementaux (Rhee 2014).

## Chapitre 1. Revue de la littérature

L'antigène O est composé de monosaccharides organisés en unités répétitives, présentant une grande diversité dans la composition des sucres. Il représente la partie la plus variable du LPS qui donne une spécificité antigénique à la molécule (Garcia-Vello et *al.* 2022).



**Figure 1.1. Structure du LPS (Mazgaeen et Gurung 2020).** man : mannose, rha : rhamnose, abe: abéquoise, gal : galactose, gln : glucosamine, P : groupe phosphate.

### 1.1.3.1.5. Biofilm

Le biofilm est l'un des mécanismes de survie des espèces bactériennes définie comme un ensemble des micro-colonies enveloppées d'une matrice de polymères extracellulaires constituée d'exopolysaccharides. La matrice de biofilm est responsable de l'adhérence aux surface biotique et abiotique et facilite la communication entre les cellules (Thi, Wibowo, et Rehm 2020a). Les biofilms jouent un rôle dans la protection des cellules bactériennes contre le système immunitaire de l'hôte. ils affaiblissent l'activité phagocytaire et le système de complément et rendent les bactéries plus résistantes aux antibiotiques (Asma et *al.* 2022)

La formation d'un biofilm se fait en plusieurs étapes (figure 1.2) :

- Etape1 : se caractérise par une adhérence réversible des bactéries à une surface biotique ou abiotique grâce à leur flagelle (Filloux et Vallet 2003).
- Etape2 : constitue l'adhésion irréversible des bactéries, la formation forment micro-colonies et l'expression des gènes responsables de la synthèse des substances polymériques extracellulaires telles que l'alginate. A ce stade, les pili de type IV permettent de maintenir la motilité de contraction (De Sousa et al. 2021a)
- Etape 3 : correspond au développement des microcolonies en structures de champignons tridimensionnelles
- Etape 4: se traduit par la perturbation de la cavité matricielle au centre de la micro-colonie par autolyse cellulaire pour la libération de cellules dispersées (Thi, Wibowo, et Rehm 2020b).

## Chapitre 1. Revue de la littérature

Et enfin, dans l'étape 5, les bactéries se dispersent de la structure sessile et retournent à l'état planctonique pour se propager et coloniser d'autres surfaces (Rasamiravaka et al. 2015).

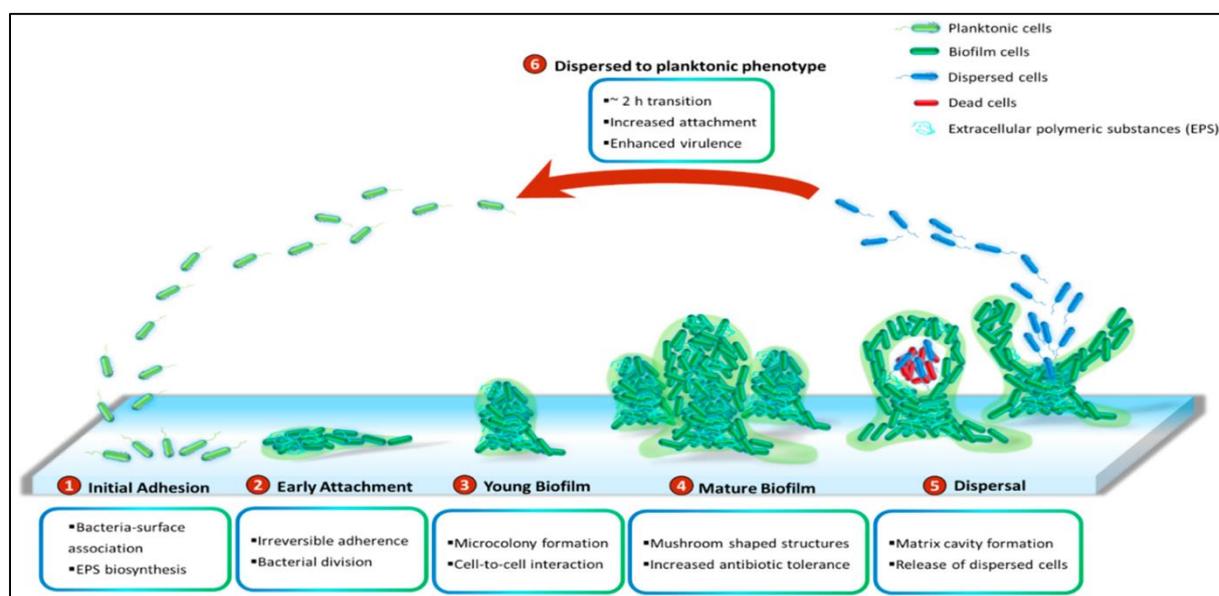


Figure 1.2. Les étapes de la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* (Thi, Wibowo, et Rehm 2020a).

### 1.1.3.2. Facteurs sécrétés

#### 1.1.3.2.1. Exotoxine A

L'exotoxine A est le facteur de virulence le plus toxique sécrété par *P. aeruginosa* qui exerce une activité enzymatique et appartient à la famille mono-ADP-ribosyltransférase (Michalska et Wolf 2015). L'exotoxine A est sécrétée par le système de sécrétion de type III (T3SS) sous la régulation par les métabolismes de fer et du glucose. Elle joue un rôle dans l'inhibition de la synthèse protéique de l'hôte en catalysant la ribosylation de l'ADP du facteur d'élongation cellulaire 2 (EF-2) et déclenche une mort cellulaire programmée. Elle est également responsable de dommage tissulaire au site inflammatoire (Liao et al. 2022a).

#### 1.1.3.2.2. Toxines

*P. aeruginosa* possède un ensemble de systèmes de sécrétion complexes, qui donnent des facteurs de virulence notamment des toxines. Le T3SS produit quatre protéines effectrices ExoS, ExoT, ExoU et ExoY qui affectent l'environnement intracellulaire et bloquent la phagocytose en provoquant une cytotoxicité qui permet la mort rapide des cellules de l'hôte via l'injection de cytotoxines (Qin et al. 2022b).

L'exotoxine S partage une analogie de séquence de 76 % avec l'enzyme exotoxine T. Ce sont à la fois des cytotoxines difonctionnelles possédant une fonction activatrice de la protéine GTPase (GAP) et une activité de l'adénosine diphosphate ribosyl transférase (ADPRT). Elles peuvent jouer un rôle dans l'induction de l'apoptose des cellules hôtes (Liao

## Chapitre 1. Revue de la littérature

et *al.* 2022a). ExoU l'effecteur, la plus virulente, est une enzyme de type phospholipase A<sub>2</sub> (PLA 2) qui est injectée dans le cytosol de l'hôte par le T3SS. Elle provoque une mort neuronale et une destruction tissulaire. Enfin, ExoY est une adénylate cyclase qui induit l'accumulation d'AMP cyclique intracellulaire et perturbe l'actine de cytosquelette pour favoriser l'arrondissement des cellules (De Sousa et *al.* 2021a).

### 1.1.3.2.3. Protéase

Les protéases jouent un rôle important dans les dommages tissulaires pendant l'infection. Il existe plusieurs protéases sécrétées telles que la protéase alcaline, l'élastase A (LasA), l'élastase B (LasB) et la protéase IV (Kida et *al.* 2008). La production de certaines protéases nécessitent des ions zinc et calcium et pour favoriser la survie de la bactérie, elles hydrolysent les peptides pour l'acquisition des nutriments en dégradant les enzymes hôtes, ou en provoquant des lésions tissulaires (Wilderman et *al.* 2001). LasA et LasB détruisent l'élastine et perturbent la fonction pulmonaire en provoquant des hémorragies (Liao et *al.* 2022a). La protéase alcaline produite par le système de sécrétion T1SS est impliquée dans diverses infections provoquées par *P. aeruginosa* et peut dégrader de nombreux composants du système immunitaire (De Sousa et *al.* 2021b). enfin, la protéase IV peut endommager les tissus de l'hôte et améliorer l'infection bactérienne par la dégradation du fibrinogène, de la lactoferrine, de la transferrine et de l'élaminine (Liao et *al.* 2022a).

### 1.1.3.2.4. Pyocyanine

*P. aeruginosa* utilise un ensemble de métabolites secondaires qui affectent les cellules par inhibition de la croissance ou mort cellulaire et qui donnent la caractéristique de virulence dans les environnements différents. L'un des principaux de ces métabolites, la pyocyanine qui est responsable de la couleur verte fluorescente du *P. aeruginosa* et qui déclenche un stress oxydatif nuisible aux cellules hôtes en générant des espèces réactives de l'oxygène (ROS), le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et endommage le tissu hôte et la fonction des organes (De Sousa et *al.* 2021b).

### 1.1.3.2.5. La lipase A

Le système de sécrétion de type II sécrète la principale lipase extracellulaire de *P. aeruginosa* : la Lipase A (LipA) qui s'accumule dans la matrice de biofilm sur des tissus infectés où elle interagit avec l'alginate d'exopolysaccharides bactérienne et facilite la libération des médiateurs inflammatoires en communication avec la phospholipase C (Papadopoulos et *al.* 2022).

### 1.1.3.2.6. Phospholipase C (PLC)

La Phospholipase C est une enzyme extracellulaire thermolabile, synthétisée dans des conditions de carence en phosphate. elle joue un rôle dans la dégradation des phospholipidique ce qui endommage les cellules hôtes (Qin et *al.* 2022b).

## Chapitre 1. Revue de la littérature

D'autres facteurs de virulences sont listés dans le tableau 1.1 ci-dessous.

**Tableau 1.1. Facteurs de pathogénicité de *P. aeruginosa* d'après (Liao et al. 2022b)**

Facteur de virulences	Fonctions
Protéines de la membrane extérieure	Adhésion bactérienne, la sécrétion de virulence et la reconnaissance de l'hôte.
Système de sécrétion de type 1 (T1SS)	Saisie des protéases alcalines, utilisation du fer, captation de l'hème
Système de sécrétion de type 2 (T2SS)	Sécrétion de diverses enzymes lytiques
Système de sécrétion du type 3 (T3SS)	Injection d'effecteurs virulents dans les cellules hôtes
Système de sécrétion de type 5 (T5SS)	Sécrétion de protéines liées à la formation et à l'adhésion du biofilm
Système de sécrétion du type 6 (T6SS)	Livraison de toxines aux bactéries voisines, translocation d'effecteurs aux cellules hôtes, formation de biofilm
Exopolysaccharides (Alginate, Pel, Psl)	Formation de biofilm, évasion immunitaire, adhérence bactérienne
Lipoxygénase (LoxA)	Interférer avec la signalisation lipidique de l'hôte et réguler le processus d'invasion bactérienne
Leucocidine	Inhibition des fonctions immunitaires de l'hôte
Sidérophores (Pyoverdine, Pyochelin)	Chélater les fers, promouvoir la croissance des bactéries, contribuer à la virulence bactérienne

### 1.4. Aspect épidémiologique

La nature multifactorielle de la pathogénicité de *P. aeruginosa* est la cause principale de sa capacité à provoquer des infections aiguës et chroniques. Ce pathogène représente l'une des causes les plus fréquentes d'infection nosocomiale chez les patients hospitalisés, notamment dans les services de soins intensifs. Ces infections sont fréquentes et constituent la principale cause de décès chez les personnes immunodéprimées et chez les patients atteints de pathologies chroniques telles que la mucoviscidose (FC), la bronchopneumopathie telles que la fibrose kystique, la bronchectasie et la neutropénie (Rossi, Ghoul, et La Rosa 2022).

### 1.5. Résistance de *P. aeruginosa*

*P. aeruginosa* est une bactérie qui présente des problèmes thérapeutiques à cause de sa résistance intrinsèque élevée due à sa très faible perméabilité et à la réduction de l'expression de la protéine membranaire externe. *P. aeruginosa* est caractérisée par sa

## Chapitre 1. Revue de la littérature

résistance à plusieurs classes d'antibiotiques, notamment les pénicillines/céphalosporines, les aminosides et les fluoroquinolones (Barbier et Wolff 2010). Plusieurs mécanismes de résistance ont été décrits chez cette bactérie (Rossi, Ghoul, et La Rosa 2022). Ces mécanismes comprennent des mécanismes innés comme la faible perméabilité de la membrane externe et des pompes à efflux, ou acquis comme des mutations génétiques chromosomiques ou un transfert horizontal ( $\beta$ -lactamases). L'action combinée de ces mécanismes rend le traitement des infections à *P. aeruginosa* particulièrement difficile (Pina-Sánchez, Rua, et Del Pozo 2023).

## Chapitre 1. Revue de la littérature

### 1.2. Les cellules lymphoïdes innées

#### 1.2.1. Historique

La première observation des leucocytes sanguins (incluant les lymphocytes, les granulocytes et les monocytes) a été faite en 1843 et la première population de cellules lymphocytaires innées mises en évidence par R. Kiessling, R.B. Herberman et leurs collaborateurs en 1975 est les cellules Natural killer (NK). Par la suite, en 1997, Mebius et ses collaborateurs ont montré l'existence d'une deuxième population de cellules lymphocytaires innées, les cellules inductrices du tissu lymphatique (LTI) et ont été mises en évidence par leur implication dans la formation des ganglions lymphatiques pendant l'embryogenèse. La découverte d'autres populations des cellules lymphoïdes innées (ILCs) a été faite à partir de 2008. En 2013, une première nomenclature a fait état de trois sous-groupes d'ILCs classifiés selon les facteurs de transcription qu'ils exprimaient et les cytokines qu'ils produisaient après activation. Nouvellement, ces cellules ont été classées en trois catégories : les ILC de type 1, les ILC de type 2 et les ILC de type 3 (Crinier et al. 2017a).

#### 1.2.2. Développement des ILCs

Dans la moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) se différencient en précurseurs lymphoïdes communs (PLP), qui donnent ensuite la naissance à des progéniteurs lymphoïdes communs (CLP), et qui sont à l'origine des ILCs (Xie et al. 2022). La différenciation des CLP en sous-ensembles des ILCs matures est contrôlée par l'expression des facteurs de transcription, tels que TCF (*T cell factor 1*), GATA3, TOX (*hymocyte selection associated high mobility group box protein*), ID2 (inhibitor of dna binding 2), PZLF (*promyelocytic leukaemia zinc finger*) et ROR (Xie et al. 2022). Les ILCs se caractérisent par l'absence des marqueurs de lignage (Lin-) associés aux cellules B et T et les récepteurs spécifiques aux antigènes. Ils expriment la sous-unité  $\alpha$  du récepteur de l'IL-7 (CD127), du proto-oncogène c-Kit (CD117), et leur développement est indépendant des recombinases (RAG= *Recombination Activating Gene*) (Crinier et al. 2017a).

L'expression des facteurs de transcription ID2 inhibe l'engagement vers le lignage B et T et la différenciation du CLP vers la voie ILC déclenche par le facteur nucléaire NFIL3 (*nuclear factor il-3 induced*) qui induit par l'IL3 et le GATA-3 (Cypowyj et Vivier 2016). Sous l'action des facteurs de transcription NFIL3 et TOX, les CLP se différencient en précurseurs lymphoïdes  $\alpha$  ( $\alpha$ LP) qui se caractérisent par l'expression de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$ , le récepteur de chimiokine (*C-X-C motif chemokine receptor 6*), CXCR6 (Elemam, Hannawi, et Maghazachi 2017). À ce stade, les précurseurs lymphoïdes  $\alpha$  ( $\alpha$ LP) tardifs ou les précurseurs lymphoïdes innés de type assistant représentent le premier embranchement au sein de la lignée cellulaire

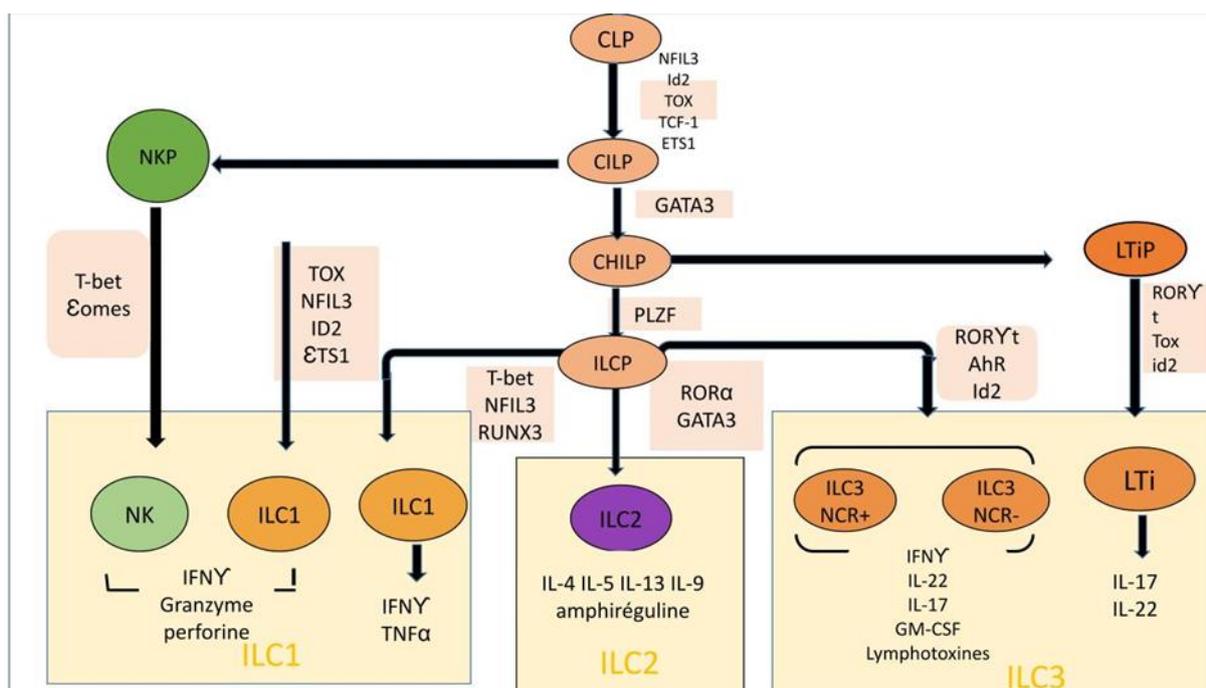
## Chapitre 1. Revue de la littérature

ILC. La population  $\alpha$ LP a également été stratifiée dès le début (Lin<sup>-</sup>, CD127<sup>+</sup>, FLT3<sup>+</sup>,  $\alpha$ 4 $\beta$ <sup>+</sup>) et tard (Lin<sup>-</sup>, CD127<sup>+</sup>, FLT3 $\alpha$ 4 $\beta$ <sup>+</sup>) (Michieletto et Henao-Mejia 2021).

Les progénitures lymphoïdes innées précoces (EILP, *Early Innate Lymphoid Progenitors*), sont les cellules engagées dans la lignée pour les ILC et les cellules NK et qui proviennent de l'IL-7R $\alpha$  exprimant des progéniteurs tels que l'ALP, commence leur différenciation par l'expression du facteur de transcription TCF1 (*T cell factor 1*) (Harly et al. 2018). Ensuite, les EILP (essentiellement des CD127<sup>-</sup> ou IL-7R<sup>-</sup>) se différencient en deux sous-populations : les sEILP spécifiés (*specified EILP*) qui peuvent donner tous les types de cellules lymphoïdes innées et des cellules dendritiques conventionnelles de type 1 (cDC1) et les cEILP engagé (*committed EILP*) qui se différencient à partir des sEILP et génèrent que les ILCs (figure 1.3) (Simoni et Newell 2018).

L'origine du premier embranchement dans la différenciation des ILC est les CILP qui se différencient soit en progéniteurs NK (NKP), soit en CILP "helper" (CHILP) *via* l'expression du facteur de transcription GATA3 et le ID2. Les CHILP se différencient en LT<sub>i</sub> (lymphoid tissue inducer cells), et en ILCP (ILC precursor) sous l'action de facteur de transcription PLZF. La cellule progénitrice LT<sub>i</sub> donne naissance aux cellules LT<sub>i</sub> qui présentes dès le stade fœtal pour initier l'organogenèse des tissus lymphoïdes secondaires, et les ILCP donne naissance à des sous-ensembles ILC1, ILC2 et ILC3 (Crinier et al. 2017a).

Au cours du développement de l'ILCs, les progénitures des cellules NK se ramifient et se développent indépendamment des populations CHILP (Diefenbach, Colonna, et Koyasu 2014). L'expression de CD122 (IL-2R) marque la décision de devenir des CLP dans la lignée NK. L'apparition de CD56 indique la transition finale des cellules NK immatures (iNK) aux cellules NK matures (Abel et al. 2018).



**Figure 1.3. Développement des cellules lymphoïdes innées (Crinier et al. 2017).** Famille ILC. La CLP donne naissance à toutes les populations lymphoïdes et est poussée vers la différenciation ILC par l'expression de Id2, devenant ainsi un progéniteur lymphoïde inné commun (CILP). Les cellules LT<sub>i</sub> et LT<sub>i</sub> se différencient de ces précurseurs, sous l'impulsion de RORYt. La différenciation vers la lignée auxiliaire ILC se produit via l'expression de GATA3 et PLZF dans CILP, après quoi ces cellules sont nommées progéniteur auxiliaire inné commun (CHILP). À partir de CHILP, les lignées ILC sont différenciées en fonction de leurs facteurs de transcription respectifs. *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* (runt related transcription factor 3), *ROR α* (RAR-related orphan receptor α), *RORYt* (RAR related orphan receptor gt), *AhR* (Aryl hydrocarbon receptor)

### 1.2.3. Sous populations

Les ILC sont subdivisées en trois groupes distincts en fonction de leur expression de cytokines et de facteurs de transcription spécifiques (figure 1.4).

#### 1.2.3.1. ILCs du groupe 1

Les ILCs du groupe 1 (ILC1s) sont définis en fonction de leur capacité à produire des cytokines effectrices dépendantes de T-bet et comprennent deux types de cellules, les cellules NK conventionnelles et l'ILC1 (Cortez et Colonna 2016). Les ILC1s produisent l'IFN-γ et le TNF sous l'effet de l'IL-12, l'IL-15 et l'IL-18. Ces cellules sont impliquées dans la surveillance immunitaire de certaines tumeurs (Crinier et al. 2017a). Elles expriment le CD200R chez la souris, le CD127 chez l'homme et le NKp46 chez l'homme et la souris (Bal, Golebski, et Spits 2020).

## Chapitre 1. Revue de la littérature

### 1.2.3.1.1. Cellules NK

Les cellules NK sont des ILC conventionnelles qui constituent un ensemble hétérogène caractérisé par l'absence de récepteurs CD3 et jouent un rôle dans le contrôle précoce des tumeurs malignes et l'élimination des cellules infectées et transformées par le virus. Les deux principales fonctions de ces cellules est la production de cytokines et la cytotoxicité (Seillet et Belz 2016; Rouzairre et al. 2012). Les progéniteurs NK génèrent des cellules NK immatures qui expriment  $CD3^- CD122^+ NK1.1^+ CD49b^-$  et n'ont pas acquises les fonctions effectrices. Leur développement et leur maturation fonctionnelle nécessitent des eomesodermin (Eomes) et le facteur T-bet. Les NK matures se caractérisent par l'expression de Nkrp1c (NK1.1), CD49b (DX5) et NKp46 et sécrètent l'IFN- $\gamma$  (Seillet et Belz 2016).

### 1.2.3.1.2. ILC1 intra-épithéliale

Il existe une autre sous-population des ILC1s appelée les ILC1 intra-épithéliale (iILC1) qui expriment le facteur de transcription T-bet et Eomes. Ces cellules peuvent produire des cytokines de type Th1 et sont cytotoxiques. Elles sont caractérisées par l'expression de CD103 et se sont établies seulement dans les muqueuses et les tissus enflammés (Simoni et Newell 2018).

### 1.2.3.2. ILC de type 2

Les ILC de type 2 sont considérées comme les homologues innés de cellules Th2. Ces cellules produisent des cytokines de type Th2 telles que l'IL5, IL-13, l'IL-6, l'IL-9 en réponse des facteurs environnementaux tels que les médiateurs lipidiques, les neurotransmetteurs, les hormones et les nutriments (Kiniwa et Moro 2021). Leur maturation dépend du facteur de transcription GATA-3 et leur développement dépend du facteur de transcription ROR $\alpha$  (Cypowyj et Vivier 2016; Crinier et al. 2017a). De plus, les ILC2 ont été décrites par leur rôle dans la réparation des barrières épithéliales et dans la lutte contre les pathogènes extracellulaires (Crinier et al. 2017a). Enfin, ces cellules ont été identifiées dans divers tissus humains notamment les tissus lymphoïdes (la rate, les ganglions lymphatiques) et non lymphoïdes (le foie, les poumons, l'intestin grêle, gros intestin) et sont impliquées dans de nombreuses maladies selon soit une activation excessive (inflammation), soit un dysfonctionnement (homéostasie tissulaire perturbée) (Kiniwa et Moro 2021).

### 1.2.3.3. ILC de type 3

Le groupe 3 des ILCs est formé par trois populations principales : LTi, NKp44 - ILC3 et NKp44 + ILC3 (Simoni et Newell 2018). Ces cellules sécrètent l'IL17 et l'IL-22 en réponse à l'IL1- $\beta$  et IL-23 et se caractérisent par l'expression du facteur de transcription ROR $\gamma$ t (*RAR-related orphan receptor gamma t*) (Cherrier 2014). Les ILC 3 jouent un rôle dans l'organisation et le développement des organes lymphoïdes et contribuent à la pathogénèse inflammatoire

## Chapitre 1. Revue de la littérature

et la protection de la muqueuse contre les entérobactéries pathogènes en maintenant la flore commensale sous contrôle (Diefenbach, Colonna, et Koyasu 2014).

ILC Group	Stimulation	Sous populations	Production
ILC Group1 	IL-12 IL-15 IL-18	NK CD127-ILC1 CD127+ILC1   	IFN-gamma Perforin Granzymes  IFN-gamma
ILC Group2 	IL-33 IL-25 TSLP NKP30L	ILC3 	IL-13 IL-5 IL-4 IL-9 Amphiregulin
ILC Group3 	IL-23 PGE IL-1 $\beta$ AHR Ligand	LTi NKP+ILC3 NKP-ILC3   	TNF-alpha IL-17 IL-22  IL-22  IL-22 IL-17

**Figure 1.4. Sous-populations de cellules lymphoïdes innées (ILCs)(Forkel et Mjösberg 2016).** Les cellules lymphoïdes innées humaines (ILC) peuvent être divisées en trois principaux groupes : les ILC du groupe 1 contenant des cellules tueuses naturelles (NK), les ILC du groupe 2 et les ILC du groupe 3. Chaque groupe est composé de sous-ensembles distincts sur la base de l'expression des facteurs de transcription et de la production de cytokines. *ILC*, innate lymphoid cells; *IFN*, interferon; *NCR*, natural cytotoxicity receptor; *TNF*, tumor necrosis factor; *TSLP*, thymic stromal lymphopoietin.

### 1.2.4. Plasticité des ILCs

En 1985 Helen Blau a proposé pour la première fois le concept de plasticité cellulaire qui désignent la capacité d'une cellule à changer d'identité (Bal, Golebski, et Spits 2020). La plasticité est définie par la capacité d'une cellule à s'adapter phénotypiquement et fonctionnellement en réponse à des facteurs environnementaux qui permettent à la cellule d'acquérir des fonctions convenables aux changements de son microenvironnement (Crinier et al. 2017b). Chaque sous-ensemble d'ILC détecte les cytokines inductives qui déclenchent leur principal programme transcriptionnel et entraînent la sécrétion de cytokines de signature (Nagasawa, Spits, et Ros 2018).

La transition d'ILC3 à ILC1 exprimant CD127 se fait sous l'influence d'IL12 qui favorise l'expression de T-bet et d'IL-15 sécrétées par les cellules dendritiques conventionnelles (cDC)

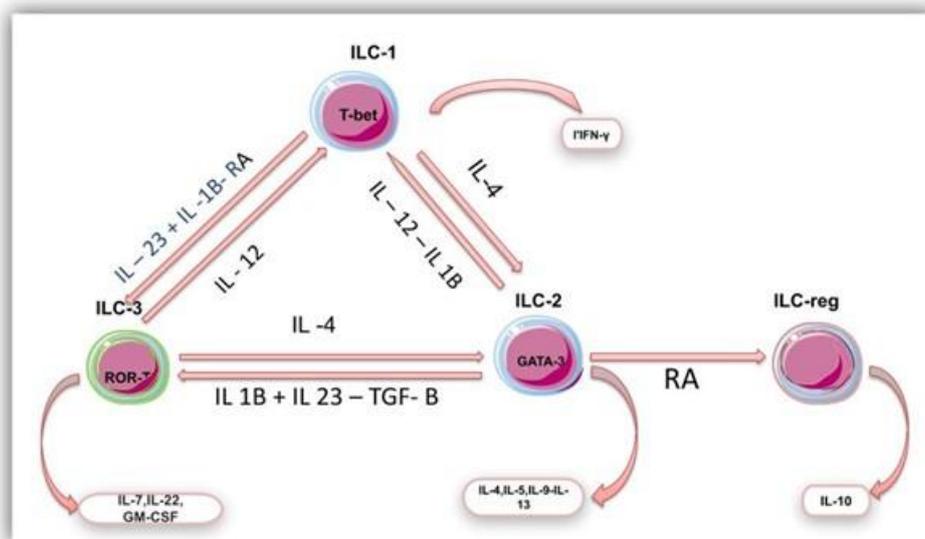
## Chapitre 1. Revue de la littérature

et les monocytes (Almeida et Belz 2016). À l'inverse, les ILC1 se différencient en ILC3 sous l'action d'IL-2, l'IL-23 et l'IL-1 $\beta$  sécrétées par les DC qui expriment le CD103 (Crinier *et al.* 2017b). L'IL-12 produit par les CD14+ intestinales transforme les ILC3 en ILC1 productrices d'IFN- $\gamma$  (Nagasawa, Spits, et Ros 2018).

Les ILC2 sont également capables de se reconverter en un phénotype sécrétant de l'IFN- $\gamma$ . L'induction de T-bet et d'IL-12R $\beta$ 2 déclenche la conversion des ILC2 vers un phénotype ILC1 (Almeida et Belz 2016). Il est à noter que l'IL-1 $\beta$  joue un rôle clé dans la transdifférenciation des ILC2. En réponse à l'IL-12, il induit des modifications du transcriptome, entraînant une induction de la transcription de TBX1 et IL12RB2 dans les ILC2, qui ouvrant la voie à la conversion en ILC1 (Nagasawa, Spits, et Ros 2018). De plus, l'IL-4 dérivé des éosinophiles inhibe la différenciation des ILC2 et favorise le retour à une ILC du groupe 2 (Almeida et Belz 2016). La différenciation des ILC2 inflammatoire en ILC3-like se fait sous l'action de l'IL-2 et de l'IL-7 et après costimulation IL-2-TLR2. Les ILC3 peuvent produire des cytokines spécifiques des ILC2, notamment l'IL-13 et de l'IL-5 (Crinier *et al.* 2017b). La combinaison de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-12 favorise les modifications épigénétiques qui améliorent l'expression de l'IL12R $\beta$ 2 dans les ILC2 et maintiennent l'acquisition du caractère ILC1 (Nagasawa, Spits, et Ros 2018).

Les ILC3 NCR- peuvent se différencier *in vivo* en ILC3 NCR+ indépendamment du facteur de transcription T-bet. La transformation des ILC3 NCR- en ILC3 NCR+ est induite *in vitro* par la voie de signalisation NOTCH et cette voie de différenciation est inhibée par le TGF- $\beta$  (Crinier *et al.* 2017b). En présence d'IL-18 et/ou d'IL-1 $\beta$ , l'IL-12 entraîne la conversion des NCR+ ILC3 en ILC1 en régulant à la baisse le ROR $\gamma$ t et en régulant à la hausse le T-bet. L'IL-7 stabilise l'expression de ROR $\gamma$ t, tandis que l'IL-12 et l'IL15 accélèrent la perte de ROR $\gamma$ t et l'acquisition de T-bet (Nagasawa, Spits, et Ros 2018).

## Chapitre 1. Revue de la littérature



**Figure 1.5. Plasticité des ILCs (Mazzurana et al. 2018).** Les ILC humaines sont des cellules hautement plastiques qui, en fonction de l'environnement tissulaire, peuvent adapter leur fonction pour répondre aux besoins du moment : GATA3, GATA binding protein 3; IFN- $\gamma$ , interféron-gamma; IL, interleukin ; ILC, cellule lymphoïde innée ; RA,acide rétinoïque ; ROR $\gamma$ t, RAR-related orphan receptor gamma-t ; T-bet, T-box expressed-in-T; TGF- $\alpha$ , Transforming Growth Factor Beta.

### 1.2.5. Fonctions des ILCs

Les ILC du groupe 1 contiennent des cellules qui possèdent la capacité de produire des cytokines inflammatoires de type 1, notamment les cellules NK (Elemam, Hannawi, et Maghazachi 2017). Après infection des cellules de l'hôte par des virus ou des bactéries, les ILC1 produisent les cytokines effectrices telles que IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  (Crinier et al. 2017). De plus, les ILC1 participent à la protection des barrières intestinales contre les infections par les bactéries par la production d'IFN- $\gamma$  et impliquées dans la surveillance immunitaire de certaines tumeurs (Simoni et Newell 2018; Crinier et al. 2017).

Les ILC2 se caractérisent par leur capacité à produire des cytokines pro-inflammatoires telles que GM-CSF, IL-3, IL-6, IL-8, IL-9 et IL-21 et des médiateurs lipidiques qui régulent la fonction ILC2 humaine (Elemam, Hannawi, et Maghazachi 2017). De plus, les ILC2 activées déclenchent des réponses inflammatoires *via* la sécrétion des cytokines de types 2 (Sunaga et al. 2022). Ces cellules participent à la surveillance des infections parasitaires en réponse à l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-13. Elles induisent la vasodilatation, la production de matrice extracellulaire et de mucus et l'activation des macrophages de type 2 (M2) pour l'élimination des parasites (Crinier et al. 2017). Les ILC2 jouent également un rôle essentiel dans l'homéostasie métabolique, où elles limitent les effets des aliments riches en graisse qui induisent l'obésité et la résistance à l'insuline (Elemam, Hannawi, et Maghazachi 2017). À partir de cellules B, l'IL-5 module la production d'anticorps et augmente la sécrétion d'IgA. Pour

## Chapitre 1. Revue de la littérature

l'exclusion des nématodes entériques parasites, l'IL-13 favorise l'activité du muscle lisse (Sunaga et al. 2022). Enfin, les ILC2 jouent un rôle dans la réparation des tissus et la cicatrisation des plaies et à cause de leur production de l'amphiréguline et participent à l'homéostasie pulmonaire et à la réparation des tissus respiratoires endommagés (Elemam, Hannawi, et Maghazachi 2017).

Les ILC3 et LTi réagissent de façon semblable aux cellules Th17. Elles jouent un rôle important dans la lutte contre les infections microbiennes extracellulaires principalement dans le tissu intestinal. Elles produisent l'IL-17, l'IL-22 et l'IFN- $\gamma$  qui contribuent dans le maintien de la stabilité de tissu intestinal et la prolifération des cellules intestinales (Castillo-González et al. 2022). L'IL-22 produite par les ILC3 régule l'absorption des nutriments par l'intermédiaire de l'épithélium intestinal, régulant ainsi le renouvellement épithélial et la maintenance des cellules souches (Domingues et Hepworth 2020). Les LTi jouent un rôle important dans la formation de tissus lymphoïdes secondaires et la défense de l'hôte grâce à la production d'IL-22. Elles stimulent la réparation des tissus et la protection immunitaire (Almeida et Belz 2016a). La signalisation IL-22 provoque la production des peptides antibactériens qui régulent le microbiote commensal et limitent l'accès à la niche épithéliale et muqueuse (Domingues et Hepworth 2020).

Après l'infection par *P. aeruginosa*, il a été observé une expansion des cellules au sein des ganglions, composées principalement des ILC qui secrètent généralement l'IL-17 et qui joue un rôle important dans la protection contre l'infection par *P. aeruginosa*. Les ILC ont la capacité à orchestrer une réponse neutrophile. Elles peuvent également produire une variété de peptides antimicrobiens telles que les défensines et les protéines S100 (Bayes, Ritchie, et Evans 2016) .

## Chapitre 1. Revue de la littérature

### 1.3. Interleukine-17

#### 1.3.1. Généralités

L'interleukine-17 (également connue sous le nom d'IL-17A) a été décrite pour la première fois en 1993 comme le produit du gène *CTLA8* (antigène cytotoxique du lymphocytes T8) identifié dans les génomes de la souris et de l'homme. C'est une cytokine pro-inflammatoire qui favorise le maintien de l'immunité innée et adaptative et joue un rôle essentiel à la défense aiguë contre les infections bactériennes et fongiques. Cette cytokine est aussi impliquée dans le développement des maladies inflammatoires telles que les maladies auto-immunes, les troubles métaboliques et le cancer (Miossec 2017). En réponse à des agents pathogènes ou à des lésions tissulaires, une diversité de cellules innées, y compris les macrophages, les DC, les cellules NK, les L<sub>Ti</sub>, les ILCs, les cellules  $\gamma\delta$ -T sécrètent l'IL-17 (Onishi et Gaffen 2010). Enfin, l'IL-17 est également produite par les lymphocytes T CD8+ et les cellules Th17 (Miossec 2017).

#### 1.3.2. Membre de la famille

Chez les mammifères la famille de cytokines IL-17 est composée 6 protéines (IL-17A à IL17F) et 5 récepteurs polypeptides (IL-17RA- RB, RC, RD et IL-17RE)(Ge, Huang, et Yao 2020). Différents types de cellules immunitaires sécrètent l'IL-17A et l'IL-17F. L'IL-17B, l'IL17C et l'IL-17D sont produits spécialement par les cellules épithéliales (Ruiz De Morales et al. 2020). L'IL-17F présente une homologie de 50% avec l'IL-17A et l'IL-17A et l'IL-17F ont une affinité de liaison privilégiée pour l'hétérorécepteur (Miossec 2017). IL-17B et IL-17D sont moins homologues et l'IL-17E partage moins de 17 % d'homologie avec l'IL-17A (Zhang et al. 2011). Tous les membres de la famille des cytokines IL-17 sont des homodimères à l'exception d'IL-17A et IL-17F (IL-17A/F) qui ont été décrits comme un hétérodimère mais pourraient exister en tant qu'homodimères et sont co-exprimés par des gènes liés (Nies et Panzer 2020).

#### 1.3.3. Récepteur et signalisation d'IL-17

Le récepteur de la liaison à l'IL-17 (IL-17RA) a été décrit pour la première fois en 1995 et la famille des récepteurs de l'IL-17 comprend cinq membres (IL-17RA, RB, RC, RD et IL-17RE). Les IL-17R sont des récepteurs transmembranaires caractérisés par un motif cytoplasmique commun appelé SEF/IL-17R (SEFIR) dans le domaine intracellulaire et une région de type fibronectine type III dans la région extracellulaire (Ge, Huang, et Yao 2020).

Les récepteurs de l'IL-17 sont largement présents dans divers types de cellules, ce qui conduit à la capacité de la plupart des cellules de répondre à cette cytokine et l'interaction

## Chapitre 1. Revue de la littérature

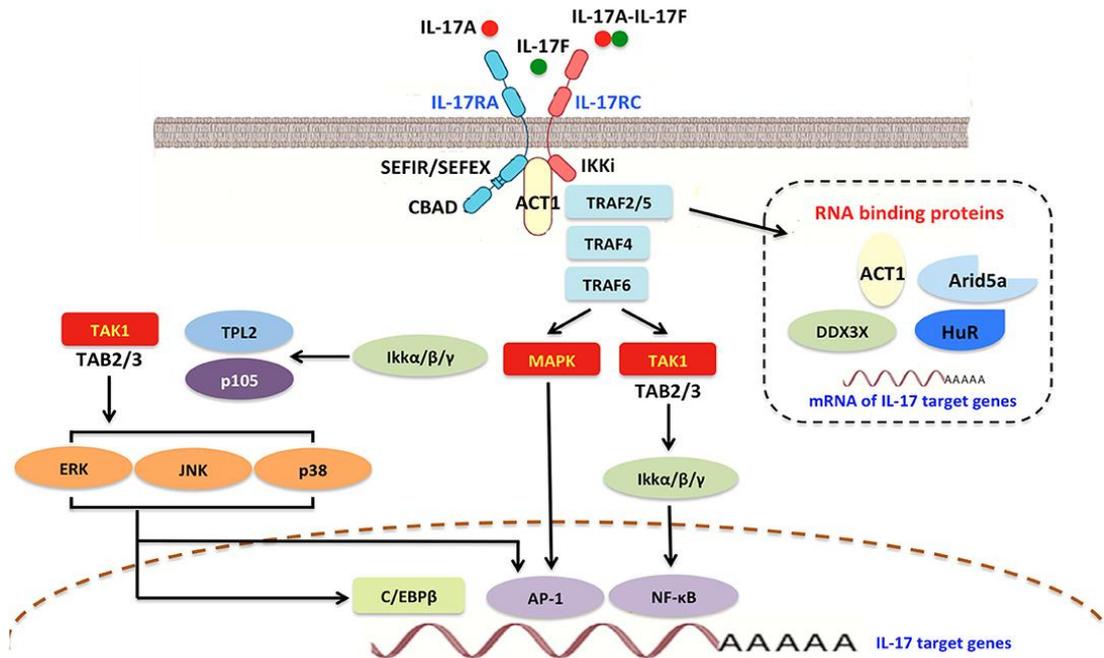
entre une IL-17 et son récepteur primaire présente une affinité élevée pour permettre la liaison (Ruiz De Morales et al. 2020).

IL-17RA est un récepteur commun à diverses isoformes de l'IL-17 et peut exercer un rôle multiples en réagissant avec d'autres récepteurs de l'IL17(RC, RB, RD ,RE)(Lorè, Chen, et Bulek 2021).

La liaison de l'IL-17A à l'IL-17RA induit le recrutement de l'IL-17RC pour former le complexe IL-17RA-IL-17RC (les ligands IL-17 ont un domaine de nœud de cystine C-terminal pour se lier aux IL-17R)(S. Chen et al. 2024). Le complexe de récepteurs est composé d'une sous-unités IL-17RA exprimée de manière ubiquitaire et d'une seconde sous-unité spécifique au ligand (IL-17RB-RE) (Nies et Panzer 2020).

L'IL-17 avec leur récepteur apparenté (IL-17R) forme une voie de signalisation essentielle pour diverses fonctions notamment la défense de hôte, la réparation tissulaire et la pathogenèse du cancer, de l'inflammation, et l'auto-immunité (S. Chen et al. 2024). Lors de la ligation des cytokines, le complexe de récepteur de l'IL-17 subit un changement de conformation permettant l'interactions entre les domaines SEFIR du récepteur et l'adaptateur de signalisation Act1(CIKS)(Chen, Liu, et Zhong 2020). Cette interaction entre les domaines SEFIR et CIKS entraînant le recrutement de TRAF6 et TAK1 pour activer NF-κB les voies canonique de la protéine kinase activée par le facteur nucléaire (NF-κB) et de la protéine kinase activée par la mitogène (MAPK), qui incluent la kinase régulée par signal extracellulaire (ERK), la p38 et la kinase amino-terminale (JNK) de la CCAAT-enhancer-binding protein (C/EBPs)(S. Chen et al. 2024)(Zhu et al., 2010).L'activation de TRAF4 en complexe avec MEKK3 et MEK5 active ERK5.La stabilité de l'ARNm des gènes contrôlés par l'IL-17 est contrôlée TRAF2 activée par l'IL-17 et TRAF5 ce qui entraînent l'activation transcriptionnelle des gènes cibles de l'IL-17A, qui jouent des rôles clés dans l'inflammation (figure1.6) (Milovanovic et al. 2020).

## Chapitre 1. Revue de la littérature

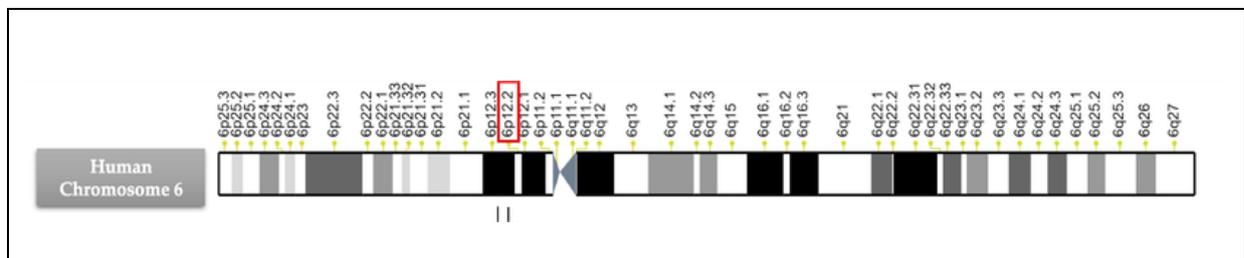


**Figure 1.6. Voie de signalisation de l'interleukine-17A (Ge, Huang, et Yao 2020).**

Initialement, la signalisation de l'IL-17R est couplée à l'Act1, qui inclut un domaine SEFIR et est nécessaire à la stabilisation de l'IL-17R-Act1. Act1 peut inclure l'ubiquitine ligase TRAF6 et E3. Lorsque la liaison ligand, TRAF2/5, TRAF4 et TRAF6 sont activés par Act1 et stabilisent l'ARNm en activant les protéines de liaison dans l'ARN Arid5a, HuR et DDX3X. L'IL-17A active AP1 et MAPK, ainsi que ses facteurs de transcription  $\delta$  et C/EBP $\beta$  (CBAD). L'IL-17A aide à réduire l'I $\kappa$ B $\alpha$  et à activer l'IKK, stimulant ainsi la signalisation NF- $\kappa$ B. Le NF- $\kappa$ B, en tournée, protège contre les maladies infectieuses et antimicrobiennes provoquées par l'IL-17A. La transmission du signal IL-17A/NF- $\kappa$ B peut augmenter le temps de réaction pour contrôler l'activation excessive de la cascade NF- $\kappa$ B. TRAF, opérateur associé au bénéficiaire du TNF ; SEFIR, expression similaire au passage des fibroblastes et de l'IL-17R ; Extension SEFEX, SEFIR ; TLR, récepteurs de type Toll ; C/EBP $\beta$ , CCAAT/protéine activatrice  $\beta$  ; Domaine d'activation CBAD, C/EBP $\beta$  ; AP1, protéine activatrice 1 ; MAPK, protéine kinase activée par un mitogène ; NF- $\kappa$ B, facteur nucléaire  $\kappa$ B ; Dégradation des kinases IKK, I $\kappa$ B $\alpha$  et I $\kappa$ B ; JNK, Janus Kinase. HuR, antigène R humain.

### 1.3.4. Structure et localisation de Gène *IL-17*

Le gène *IL17A* est situé sur le chromosome 6p12 chez l'homme (figure 1.7) (chez la souris sur le chromosome 1A4). Il comprend trois exons et deux introns et code pour six protéines (IL-17A-F) de poids moléculaire 20 à 30 kDa (Ge, Huang, et Yao 2020) (Thiam et al. 2024).



**Figure 1.7. Localisation du gène *IL-17A* sur le chromosome 6 humain (Thiam et al. 2024).**

La structure d'IL-7 présente quatre résidus de cystéine formant des ponts disulfures intramoléculaires, deux inter liaisons disulfures en chaîne qui lient de manière covalente deux

## Chapitre 1. Revue de la littérature

monomères et une terminaison C conservée (S. Liu et *al.* 2013). L'IL-17A est composée de 177 acides aminés, contenant le N peptide signal terminal, le site de glycosylation lié à N et résidus de cystéine conservés parmi la famille IL-17(Zhang et *al.* 2011). Les structures des parties C-terminales de ces cytokines sont très similaires et les séquences dans les extrémités N-terminales de l'IL-17 sont très variables (Jin et Yin 2019).

### 1.3.5. Fonctions d'IL-17

Les membres de la famille des cytokines de l'IL-17 ont différentes fonctions biologiques. Elles favorisent les réponses immunes protectrices contre de nombreux agents pathogènes et sont impliqués dans la pathologie inflammatoire lors de l'infection et l'auto-immunité (Mills 2023). De plus, IL-17 peut déclencher une puissante réponse inflammatoire comprenant la production de ligands de chimiokine (motif C-C)-20 et de facteur de stimulation de la lignée (G-CSF), qui agissent en synergie avec d'autres cytokines pro-inflammatoires (par exemple, le TNF-, l'IL-6 et l'IL-1) pour induire le recrutement de neutrophiles (Zenobia et Hajishengallis 2015). Les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) produisent l'IL-23 et IL-1 en réponse aux protéines de stress, les modèles moléculaires associés aux pathogènes (PAMP), ou les métabolites microbiens pour accélérer la libération d'IL-17 dans les sites d'infections (Ge, Huang, et Yao 2020).

En réponse à une invasion chronique des agents pathogènes, l'IL-17A stimule les macrophages et les neutrophiles pour produire des AMP, y compris les défensines, les lipocalines, les protéines S100, les lactoferrines et les protéines de régénération (REG), pour aider à tuer les bactéries (Iwakura et *al.* 2011) et peut induire d'autres protéines, notamment les protéines nitriques inductibles oxyde synthase (iNOS) et cyclooxygénase-2 (COX-2)(Ge, Huang, et Yao 2020). L'IL-17 également favorise l'expression de divers gènes antimicrobiens telles que 24p3 qui joue un rôle important dans la défense de l'hôte grâce à sa capacité de se lier aux sidérophores bactériens et à l'inhiber, limite ainsi l'absorption du fer par des certaines bactéries (Ge, Huang, et Yao 2020).

L'IL-17 est une cytokine qui réagit comme une cytokine anti- ou protumorale. Il a été démontré que l'IL-17 inhibe l'apoptose des cellules dysplasiques et favorise l'angiogenèse, l'invasion, les métastases et le recrutement des macrophages associés aux tumeurs (TAM) (Ruiz De Morales et *al.* 2020). Enfin, IL-17 peut favoriser la destruction du tissu conjonctif et du tissu sous-jacent en stimulant la production de métalloprotéinases matricielles (MMP) et RANKL des cellules stromales (Zenobia et Hajishengallis 2015).

L'IL-17 et l'IL-22 produits par ILC3s peuvent induire des mécanismes de défense épithélial et des réponses granulocytaires pour lutter contre les infections bactériennes et fongiques extracellulaires (Sedgwick et *al.* 2020).

Chapitre 1. Revue de la littérature

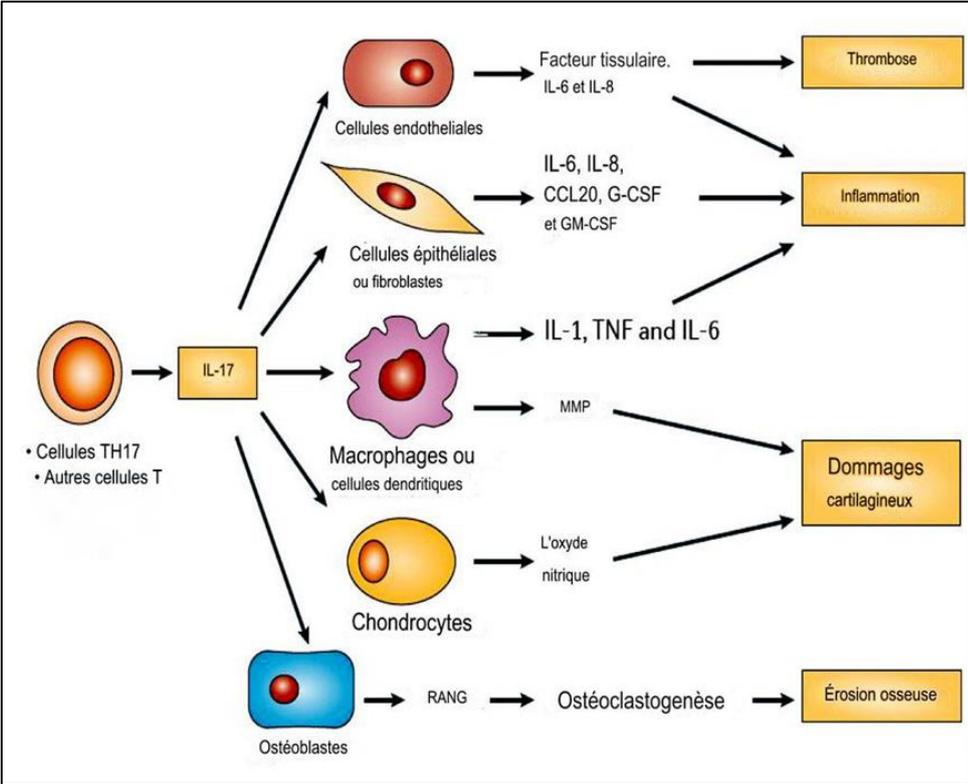


Figure 1.8. Effet biologique d'IL17 (Milovanovic et al. 2020).

## **Chapitre 1. Revue de la littérature**

### **1.4. Réaction de polymérisation en chaîne**

#### **1.4.1. Définition**

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) est une technique puissante pour amplifier un fragment spécifique de l'ADN dans les laboratoires. Cette technique a été développée par Mullis et ses collègues au début des années 1980. Grâce à sa capacité à produire des résultats rapides, spécifiques et quantitatifs, la PCR est devenue un outil essentiel dans de nombreuses applications et dans plusieurs domaines, y compris la recherche biologique et médicale pour analyser l'expression des gènes et de mutation, étudier le génotypage et détecter les agents pathogènes (Wages 2005).

#### **1.4.2. Principe de la PCR**

La PCR est une technique qui permet de synthétiser de millions de copies d'une séquence d'ADN à partir d'un extrait d'ADN. Elle est basée sur l'utilisation de l'ADN polymérase, l'enzyme clé qui lie les nucléotides individuelles pour former le produit du PCR à l'aide d'un thermostable et d'un thermobloc automatisé qui permet des changements rapides de température (Wages 2005). Chaque test PCR nécessite la présence d'ADN matrice, d'amorces, de nucléotides et d'ADN polymérase.

La PCR permet d'amplifier des séquences dont la taille est inférieure à 6 kb. La réaction PCR est extrêmement rapide et elle ne dure que quelques heures (2 à 3 heures pour une PCR de 30 cycles) (Garibyan et Avashia 2013).

La PCR comprend trois étapes principales : dénaturation de l'ADN cible, hybridation avec les amorces, et élongation. Après le premier cycle, chaque molécule de matrice a été amplifiée en deux molécules et à chaque fois ces trois étapes sont répétées plusieurs fois (Shafeeq 2021).

#### **1.4.3. Composants de la PCR**

##### **1.4.3.1. L'ADN**

L'échantillon d'ADN contient la séquence cible et qui est extrait à partir de l'échantillon que l'on veut analyser (salive, cheveux, cellules, le sang périphérique ...). Cette séquence doit être amplifiée avant d'être analysée. Au début de la réaction, une température élevée est appliquée à la molécule d'ADN double brin pour séparer les brins (Garibyan et Avashia 2013)

##### **1.4.3.2. Les amorces**

Les amorces représentent des petits fragments d'ADN (oligonucléotides) nécessaires à l'accrochage de la polymérase avec un arrangement pour compléter et amplifier la cible ADN. La taille de ces amorces est comprise entre 10 et 30 nucléotides pour assurer une

## Chapitre 1. Revue de la littérature

hybridation suffisamment spécifique sur la séquence souhaitée d'ADN matrice (Shafeeq 2021). L'une des amorces est créée pour reconnaître par complémentarité une séquence du brin sens 5'-3' du fragment d'ADN, l'autre pour reconnaître par complémentarité brin antisens (3'-5') du même fragment d'ADN (Lorenz 2012). Les amorces sont des ADN simple brin dont l'hybridation sur les séquences encadrent la séquence d'intérêt va permettre sa réplication de manière sélective (Kadri 2020).

Plusieurs caractéristiques doivent être prises en considération lors de la conception des amorces :

- La longueur de l'amorce doit être de 15 à 30 résidus nucléotidiques (bases).
- La teneur optimale en G-C devrait situer entre 40 et 60%.
- L'extrémité 3' des amorces doit contenir un G ou un C afin d'enserrer l'amorce et d'empêcher la "respiration" des extrémités. La « respiration » de l'ADN se produit lorsque les fins ne restent pas recuites mais se délaite où se détachent. Les trois liaisons hydrogène par paires GC aident à empêcher la respiration et à augmenter la température de fusion des amorces.
- Les extrémités 3' d'un ensemble d'amorces contenant des amorces à brins positif et négatif ne doivent pas être complémentaires les unes des autres, et les extrémités 3' d'une seule amorce doivent être complémentaires des autres séquences de l'amorce. Ces deux scénarios conduisent respectivement à la formation de structures amorce-dimère et boucle en épingle à cheveux.
- Les températures optimales de fusion ( $T_m$ ) pour les amorces devraient être comprises entre 52 et 58 degrés Celsius, mais la plage peut être étendue à 45-65 degrés Celsius. La différence entre les  $T_m$  finales des deux amorces ne doit pas dépasser 5 degrés Celsius.
- Les répétitions de dinucléotide (par exemple, GCGCGCGCGCGC ou ATATATATAT) ou des séries à une seule base (par exemple, AAAAA ou CCCCC) doivent être évitées car elles peuvent provoquer un glissement le long du segment amorcé de l'ADN et de la boucle en épingle à cheveux. S'il est inévitable en raison de la nature de la matrice d'ADN, n'incluent que les répétitions ou séquences d'une seule base avec un maximum de 4 bases (Lorenz 2012).

### 1.4.3.3. Les nucléotides

Les nucléotides comprennent les quatre bases adénine, thymine, cytosine et guanine (A, T, C, G) présentes dans l'ADN. Elles agissent comme des éléments de base utilisés par l'ADN polymérase pour créer le produit PCR résultant (Garibyan et Avashia 2013).

### 1.4.3.4. L'enzyme, Taq polymérase

## **Chapitre 1. Revue de la littérature**

L'utilisation d'une ADN polymérase purifiée ou clonée à partir d'une bactérie *Thermus aquaticus*, qui vit dans les sources chaudes et résiste à des températures élevées est indispensable. L'ADN polymérase Taq est un type d'enzyme qui synthétise de nouveaux brins d'ADN complémentaires de la séquence cible et une enzyme clé qui joue un rôle important en garantissant la fidélité de la réplication de l'ADN et assurer des résultats précis et fiables. Cette polymérase a la caractéristique de résister à des températures avoisinant les 100°C, généralement suffisantes pour dénaturer la plupart des protéines ADN polymérase permet la réplication (Kadri 2020)

### **1.4.3.5. Ions de Mg<sup>2+</sup>**

L'ion Mg<sup>2+</sup> agit comme un cofacteur essentiel de l'activité la Taq Polymérase. Ces ions permettent l'incorporation des dNTPs pendant la polymérisation et facilitent l'hybridation entre l'amorce et la matrice d'ADN en stabilisant la charge négative du groupe phosphate. Les ions Mg<sup>2+</sup> se lient au site actif de l'enzyme et catalysent la formation d'une liaison phosphodiester entre le groupe 3'-OH d'un dNTP et le groupe phosphate d'un autre dNTP(Lorenz 2012).

### **1.4.3.6. Le thermocycleur**

Le thermocycleur est un appareil thermique qui effectue la réaction PCR. Cette machine chauffe et refroidit les tubes réactionnels à la température requise pour chaque étape de réaction (Shafeeq 2021).

## **1.4.4. Etapes de la PCR**

Il existe 3 étapes essentielles dans la technique 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 par l'élévation de la température. La première période s'effectue à une température de 94°C, appelée température de dénaturation. A cette température, l'ADN matriciel, qui sert de matrice lors de la réplication, est dénaturé : les liaisons hydrogène ne peuvent être maintenues à une température supérieure à 80°C et l'ADN double brin est dénaturé en ADN simple brin (Kadri 2020) .

### **1.4.4.2. L'hybridation**

La deuxième étape est l'hybridation dans cette étape, la température de réaction est abaissée pour permettre l'hybridation des amorces sur l'ADN cible. Elle est réalisée à une température généralement comprise entre 40 et 70°C, appelée température d'hybridation des

## **Chapitre 1. Revue de la littérature**

amorces. La diminution de la température permet aux liaisons hydrogène de se reformer et de s'hybrider les brins complémentaires. Les amorces s'hybrident plus facilement que l'ADN matriciel long brin. Plus la température d'hybridation est élevée, plus l'hybridation est sélective et spécifique (Wages 2005).

### **1.4.4.3. L'élongation**

La phase finale comporte une période d'allongement prolongée réalisée à une température de 72°C, appelée température d'allongement et une durée dépend de la longueur et de la composition de l'amplicon. Cette dernière étape permet la synthèse du brin complémentaire (Lorenz 2012). À 72°C, la Taq polymérase se lie aux ADN simple brin amorcés et catalyse la réplication en utilisant les désoxyribonucléoside triphosphates présents dans le mélange réactionnel. Les régions de l'ADN matrice en aval des amorces sont ainsi synthétisées sélectivement. Au cycle suivant, les fragments synthétisés au cycle précédent sont à leur tour matriciels et après quelques cycles, l'espèce prédominante correspond à la séquence d'ADN entre les régions où les amorces s'hybrident. Il faut 20 à 40 cycles pour synthétiser une quantité analysable d'ADN. Chaque cycle double théoriquement la quantité d'ADN présente dans le cycle précédent (Kadri 2020).

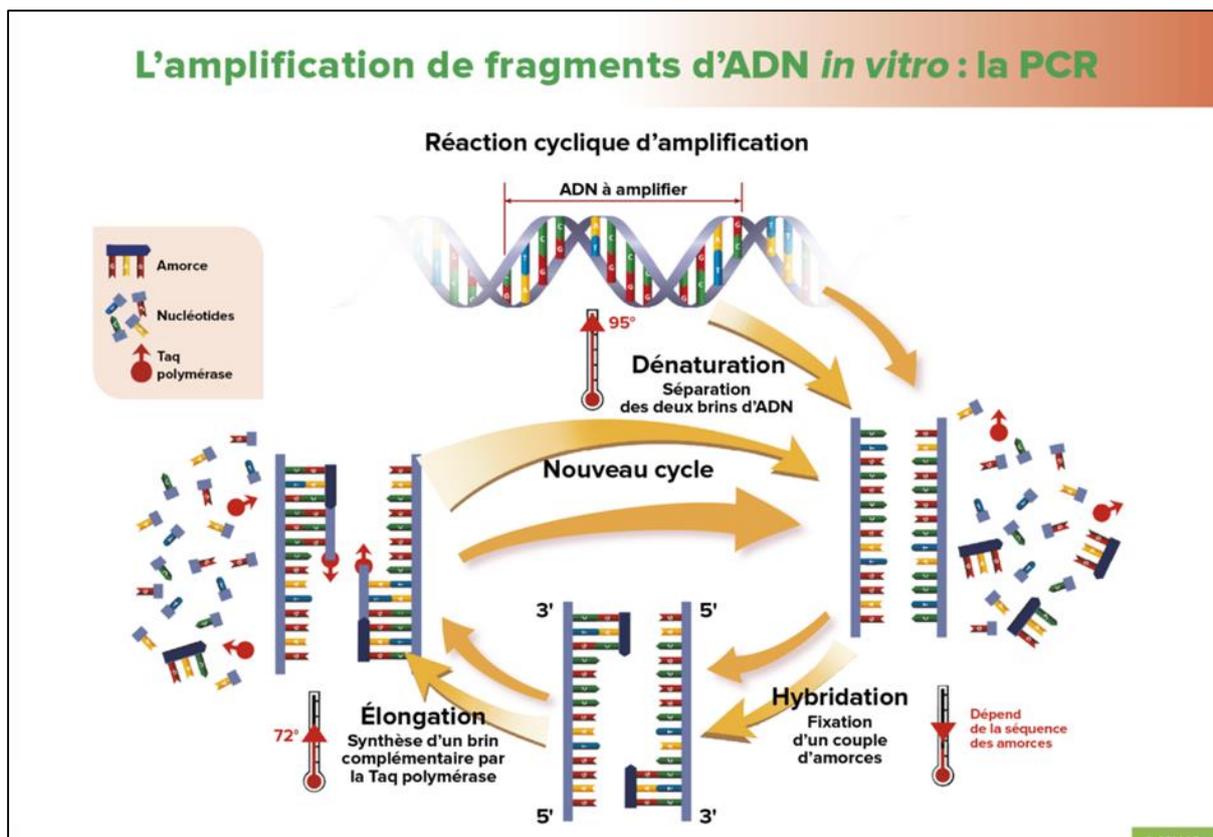


Figure 1.9. Représentation schématique de la réaction de polymérisation en chaîne (Garibyan et Avashia 2013)

## **Chapitre 1. Revue de la littérature**

### **1.5. Problématique et Objectif**

#### **1.5.1. Problématique**

Au cours des dernières années, une nouvelle population de cellules immunitaire qui jouent un rôle important dans le développement et le maintien de l'immunité a été identifiée. Ces cellules sont les ILCs. A la base des capacités fonctionnelles, des profils cytokiniques et de l'expression des facteurs de transcriptions, ces cellules se différencient en 3 sous-populations ILC1s, ILC2s et ILC3s. Les ILC3s jouent un rôle important dans la protection contre l'infection bactérienne et la défense de l'hôte. Elles réagissent de façon semblable aux cellules Th17 par l'expression du facteur de transcription ROR- $\gamma$  et la sécrétion de l'IL-17 et l'IL-22 en réponse à la stimulation de l'IL-23 et de l'IL-1. De plus, Il a été montré que l'IL-17 induit la sécrétion des chimiokines, telles que CCLX8 qui favorise le recrutement des neutrophiles vers le site d'infection.

La conception des amorces est une étape essentielle pour la réussite de la réaction de la PCR, une technique qui permet l'amplification du gène *IL-17A* pour examiner son expression dans les ILC3s au cours d'infection bactérienne par *P. aeruginosa*.

#### **1.5.2. Objectif**

L'objectif est de concevoir des séquences d'oligonucléotides qui seront utilisé des amorces à l'amplification du gène *IL-17A* par PCR.

#### **1.5.3. But**

Ce travail consiste à la création des amorces spécifiques au gène *IL-17A* pour identifier son taux d'expression par les ILC3s au cours des infections bactériennes.

## **Chapitre 2. Matériel et méthodes**

## **Chapitre 2. Matériel et méthodes**

### **2.1. Conception des amorces**

La conception d'amorces représente une étape essentielle pour la réalisation d'une bonne PCR. Elle est utilisée pour amplifier spécifiquement une séquence cible et nécessite de nombreux paramètres, notamment une température de fusion ( $T_m$ ) similaires, teneur en GC équilibrée, et doivent éviter l'auto-complémentarité et la formation en épingle à cheveux (Rahman et al. 2020).

Afin d'amplifier une région spécifique de l'ADN, la paire d'amorces utilisée doit être complémentaire au brin d'ADN et orientée dans le bon sens 5'→3' pour permettre à l'ADN polymérase la synthèse du brin complémentaire (Lorenz 2012).

Lors de la conception des amorces pour la PCR, plusieurs critères doivent être respectés, à savoir :

#### **•La longueur de l'amorce**

Les amorces doivent avoir une longueur de 18 à 24 bases et coder uniquement pour les sites spécifiques de la séquence à amplifier. La longueur de l'amorce affecte la réussite de la PCR en influençant la spécificité, la température de fusion et le temps de recuit (Apte et Daniel 2009).

#### **•Température de fusion ( $T_m$ )**

Les paires d'amorces doivent avoir des températures de fusion similaires situées entre 56 et 62°C, et ne doivent pas différer de plus de 5°C pour les deux amorces (Lorenz 2012).

#### **•La spécificité**

La caractéristique essentielle de l'amorce est la spécificité de la cible. Les amorces doivent être spécifiques de la région à amplifier. Cette spécificité dépend partiellement de la longueur de l'amorce. De ce fait, les amorces doivent être sélectionnées de manière à ce qu'elles présentent une séquence unique dans l'ADN matrice qui doit être amplifiée. De plus, une température de fusion de 55 à 72 °C offre les meilleurs résultats (O'Halloran 2016).

#### **•La teneur en GC**

La teneur optimale en G-C doit être située entre 40 et 60 % (Lorenz 2012).

#### **•Séquence à l'extrémité 3'**

Au cours d'une technique PCR, il est démontré que la position terminale 3' est essentielle pour éviter le désamorçage, et l'inclusion d'un résidu G ou C à l'extrémité 3' des

## Chapitre 2. Matériel et méthodes

amorce augmente l'efficacité de l'amorçage (Bustin, Mueller, et Nolan 2020). L'utilisation des extrémités 3' des amorces PCR afin de prévenir les homologies au sein d'une paire d'amorces qui pourraient conduire à un faux amorçage et à la production d'amplicons non spécifiques (Apte et Daniel 2009).

- **Séquences d'amorces complémentaires**

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 » peuvent se former et perturberont l'hybridation avec la matrice.

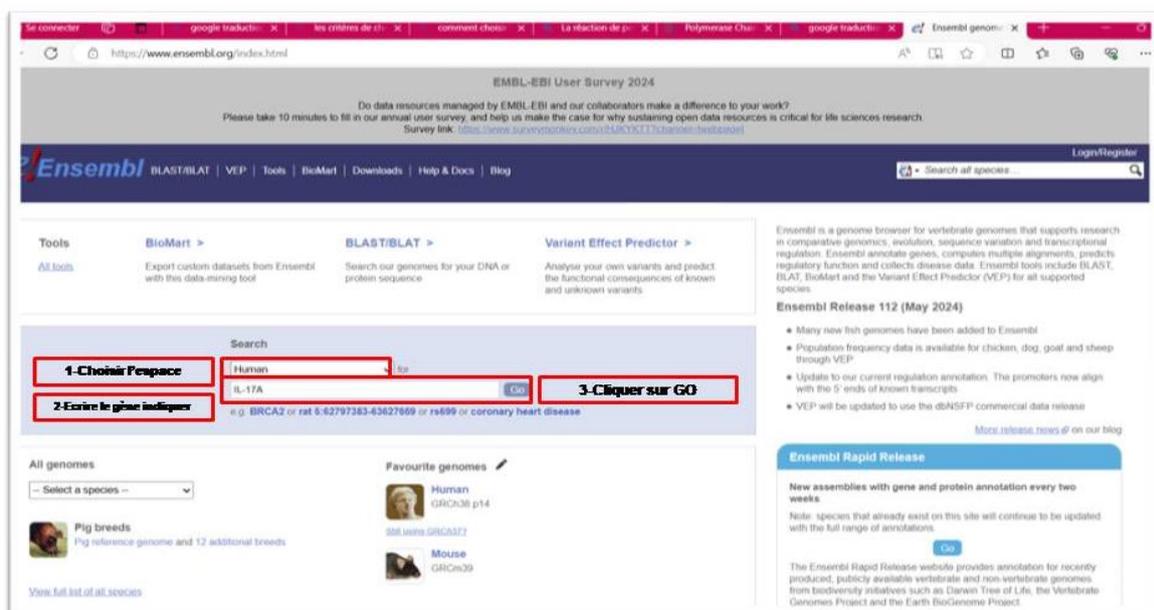
Un autre risque similaire est l'homologie inter-amorce. L'hybridation peut être perturbée par l'homologie partielle dans les régions centrales de deux amorces.

Les extrémités 3' d'un ensemble d'amorces ne doivent pas être complémentaires les unes des autres, et la complémentarité entre les amorces entraînent la formation de dimères d'amorce (Lorenz 2012).

## 2.2. Conception des amorces pour amplifier le gène *IL-17A*

### 2.2.1. Détermination de la séquence du gène *IL-17A*

La conception des amorces commence par la recherche de la séquence de référence du gène *IL-17A*, en utilisant la base de données Ensembl dans le site [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) (figures 2.1, 2.2, 2.3 et 2.4). Lors de la recherche la séquence du gène *IL-17A*, il faut spécifier d'espèce humaine.



**Figure 2.1. Plateforme de la base de données Ensembl.** (1) spécifier l'espèce Humaine. (2) écrire le nom du gène *IL17A* ensuite. (3) cliquer sur GO pour afficher les résultats de la recherche (tous est encadrer en rouge).

## Chapitre 2. Matériel et méthodes

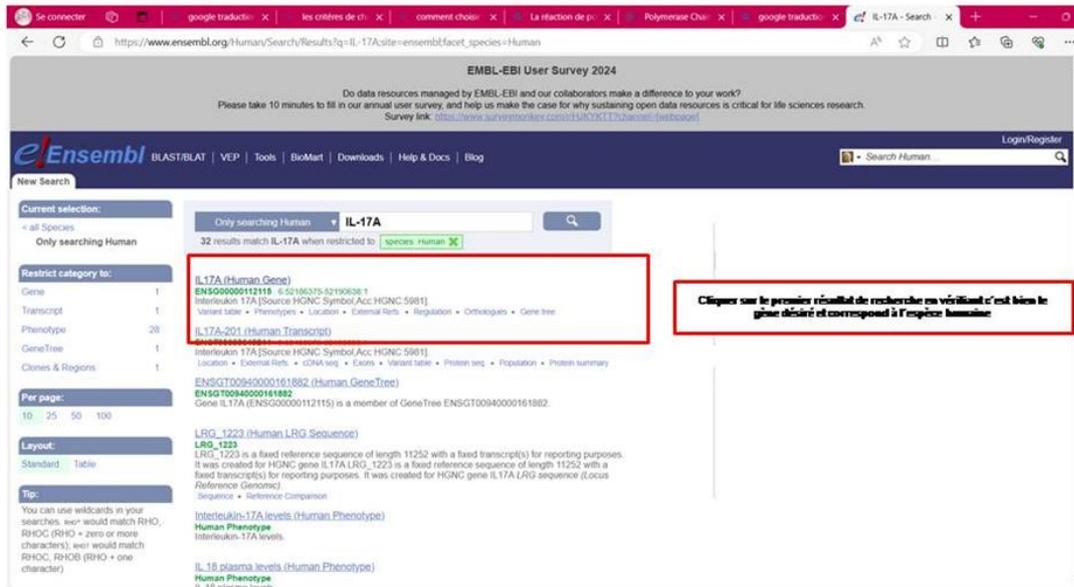


Figure 2.2. Résultats de la recherche du gène *IL-17A*. Cliquer sur le premier résultat et vérifier le gène désiré et qui correspond à l'espèce humaine (Human Gene) (encadrer en rouge).

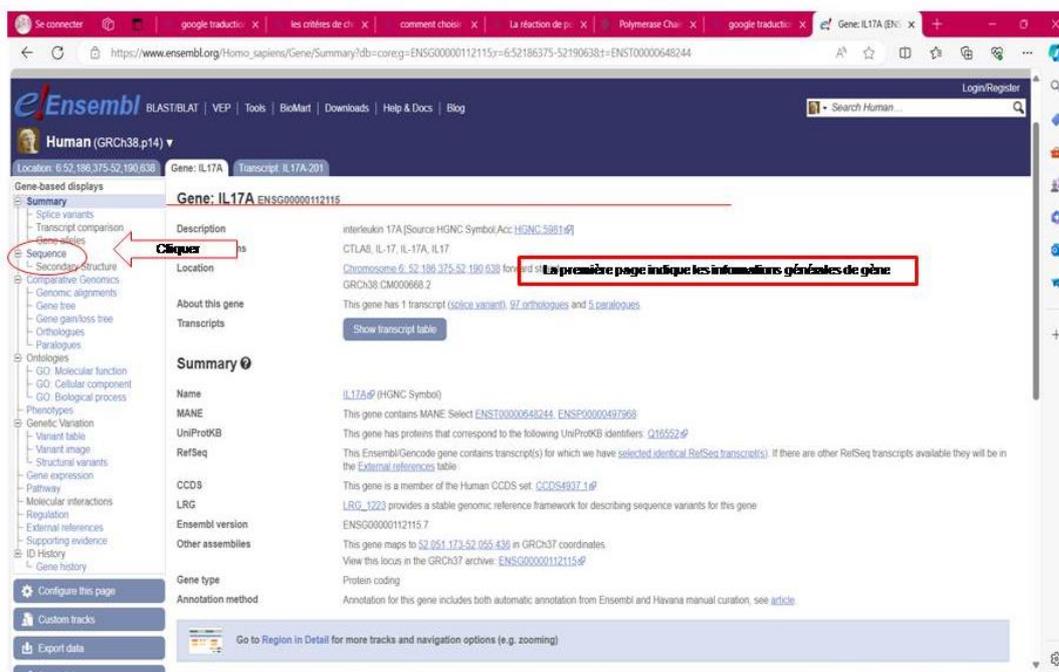
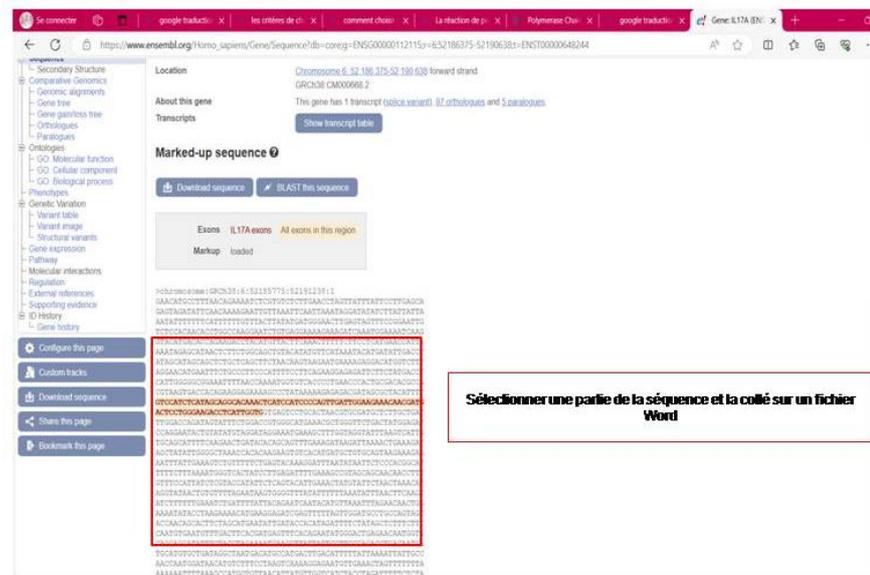


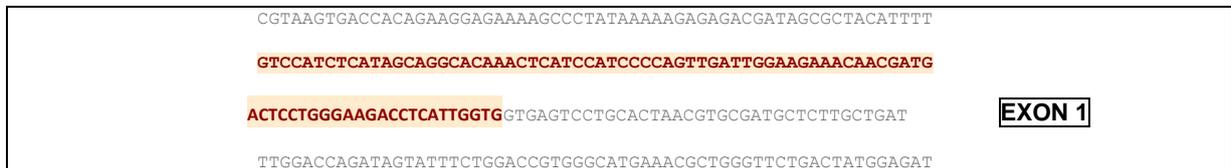
Figure 2.3. Caractéristiques du gène *IL-17A*. La plateforme Primer-BLAST montre les différentes caractéristiques du gène *IL-17A*. Il faut cliquer sur Séquence pour afficher la séquence du gène *IL-17A* (en rouge).

## Chapitre 2. Matériel et méthodes



**Figure 2.4. La séquence du gène *IL-17A* 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 *IL-17A*, qui contient des séquences codantes –les exons- (caractères en rouge) et séquences non codantes-les introns- (caractères en noir), puis notre séquence est copiée dans un fichier Word et la séquence d'intérêt est encadrée comme montré dans cette figure. Dans ce travail, j'ai choisi la séquence comportant l'exon 1 (figure 2.5).



**Figure 2.5. La séquence de l'exon 1 du gène *IL-17A*.**

### 2.2.2. Design des Primers : L'outil Primer-BLAST

A l'aide la base de données du National Center For Biotechnology Information (NCBI) nous avons utilisé le logiciel Primer blast sur le site [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) afin de concevoir les bonnes paires d'amorces (figure 2.6). Le Primer-BLAST un outil de conception d'amorces populaire pour amplifier spécifiquement une séquence modèle ou un ensemble de modèles associés à partir d'une population d'acides nucléiques.

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

## Chapitre 2. Matériel et méthodes

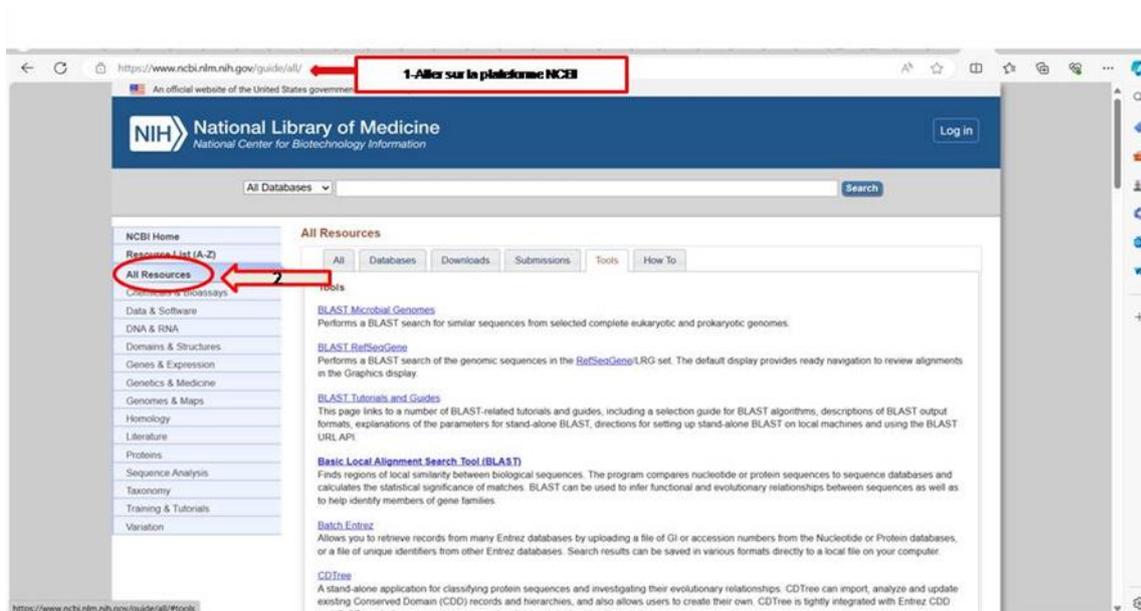


Figure 2.6. Le site NCBI.

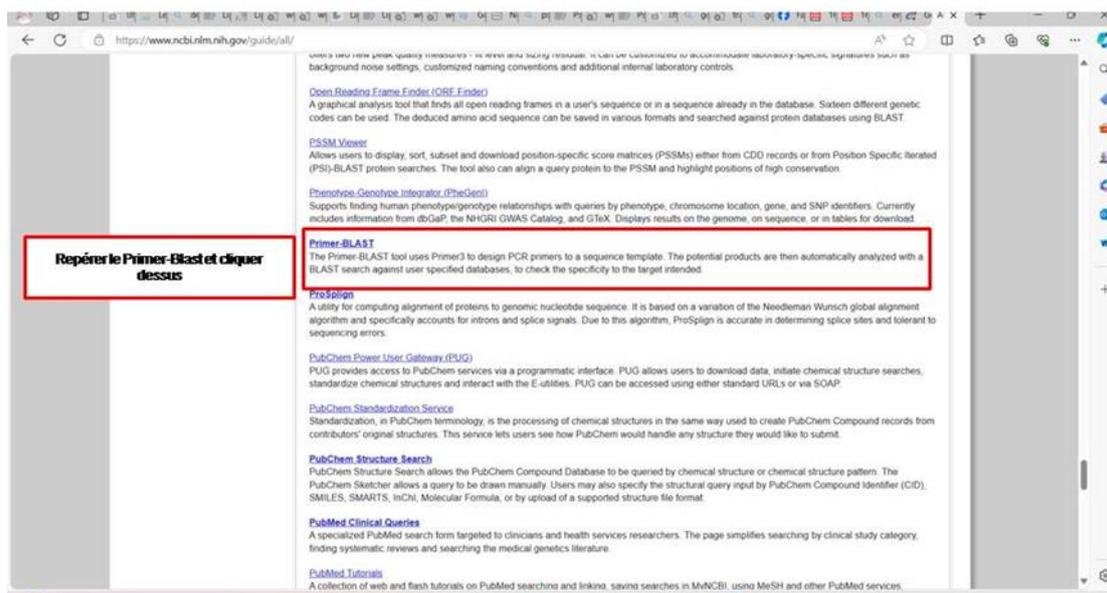


Figure 2.7. L'outil Primer-BLAST.

## Chapitre 2. Matériel et méthodes

**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.

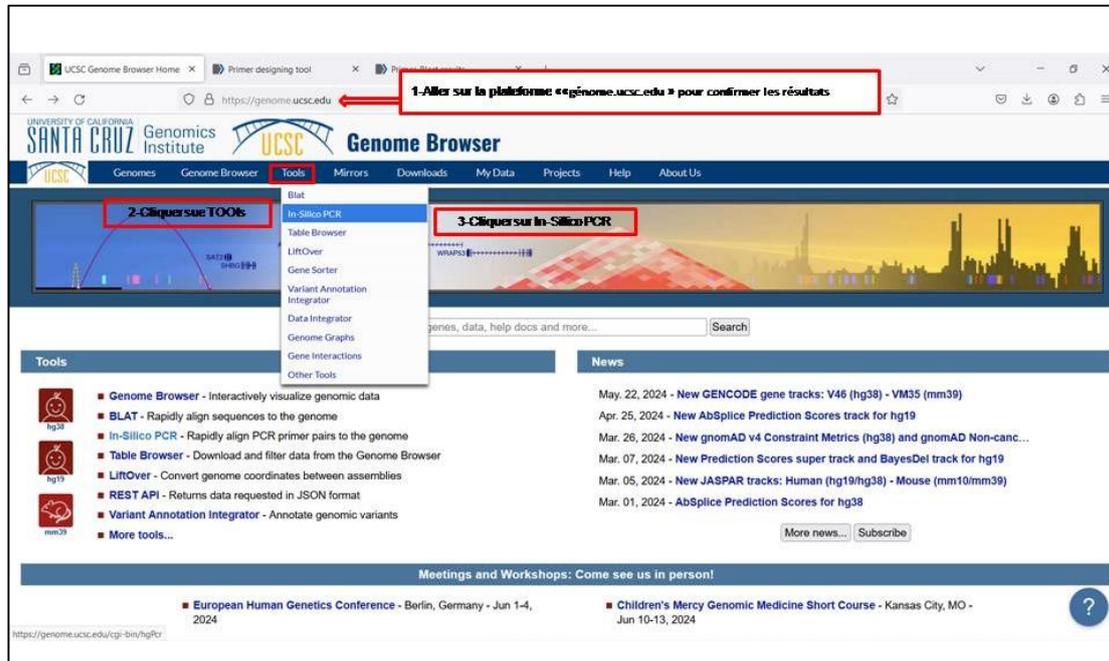
**Figure 2.9. Paramètres de vérification de la spécificité des paires d'amorces (Primer Pair Specificity Checking Parameters).** Faire défiler la page en bas, puis (1) sélectionner la case ou c'est écrit « RefSeq mRNA » et choisir « Genomes for selected organisms », (2) vérifier l'espèce que c'est bien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

## Chapitre 2. Matériel et méthodes

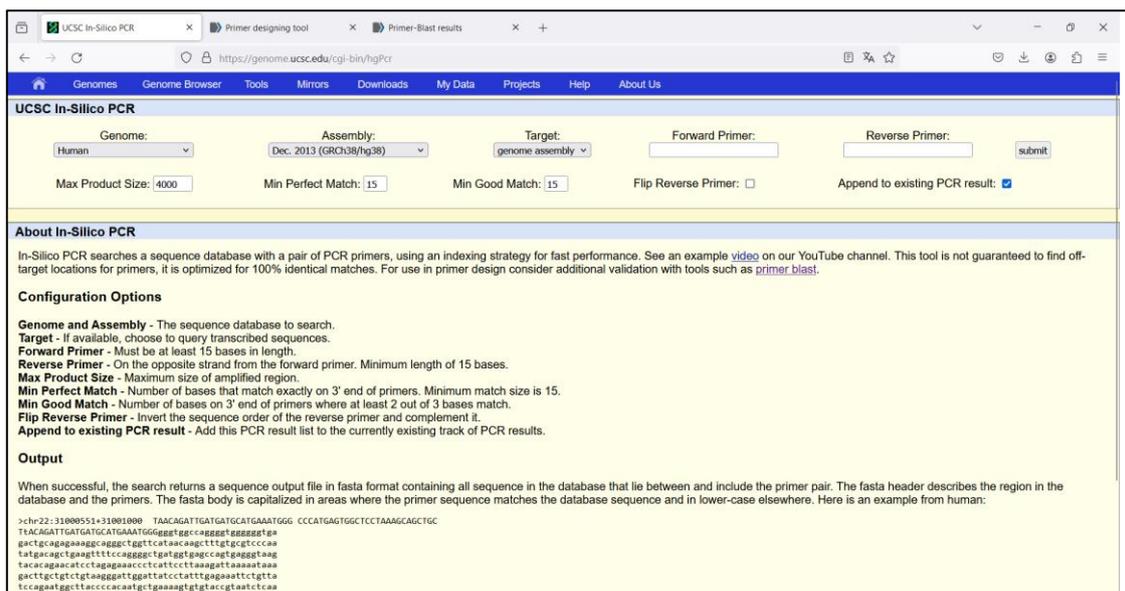
Les amorces choisies doivent répondre aux critères de choix de bonnes amorces.

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

Afin de vérifier la fiabilité des amorces, nous avons réalisé une analyse de confirmation de nos résultats de primer Blast grâce à une réalisation d'une PCR *in silico* (PCR virtuelle) au site «genome.ucsc.edu» (figures 2.10 et 2.11).



**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 ».



**Figure 2.11. Le site *In-Silico* PCR.**

## Chapitre 3. Résultats

### Chapitre 3. Résultats

#### 3.1. Résultats de la conception des amorces

##### 3.1.1. Résultats du Primer-BLAST

La conception des amorces spécifiques du gène *IL17A* a passé par plusieurs étapes. Tout d'abord, on a utilisé le site Ensembl pour avoir la séquence du gène *IL-17A*. Ce gène est constitué de 3 exons. Dans ce travail, nous avons choisi l'exon 1. Ensuite, nous avons utilisé l'outil Primer-blast de la base de données NCBI pour la conception de nos amorces. Ce dernier, nous a permis d'avoir 5 paires d'amorces propres au gène *IL-17A* de l'exon 1.

Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5 et 3.6.

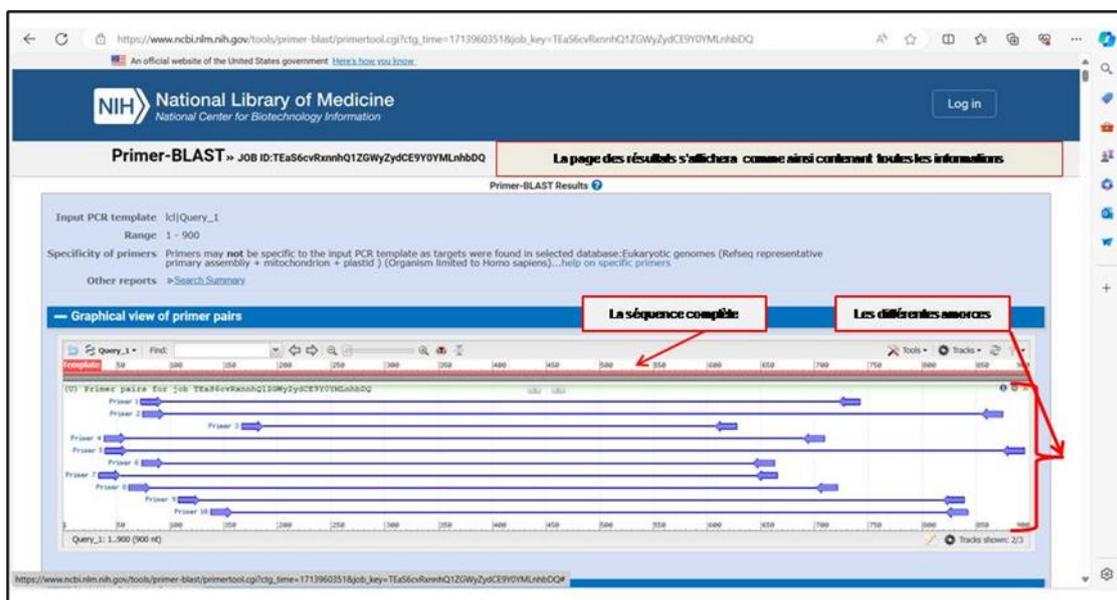


Figure 3.1. Résultats du Primer-BLAST. La page des résultats s'affiche comme en dessus, en rouge c'est la séquence complète et les flèches en bleu représentent les différentes amorces.

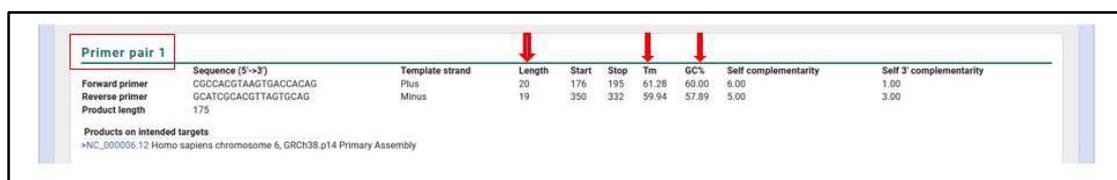


Figure 3.2. Primer pair 1.

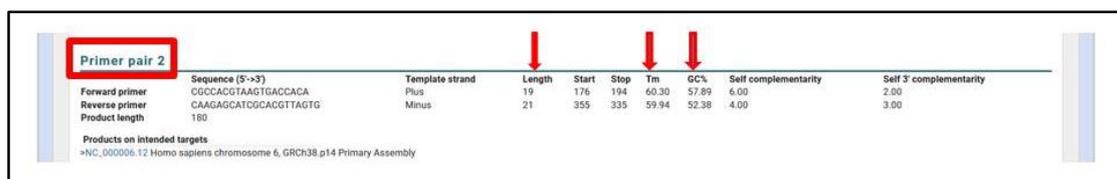


Figure 3.3. Primer pair 2.

## Chapitre 3. Résultats

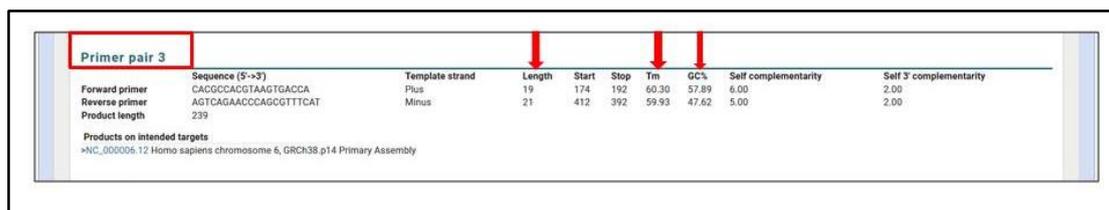


Figure 3.4. Primer pair 3.

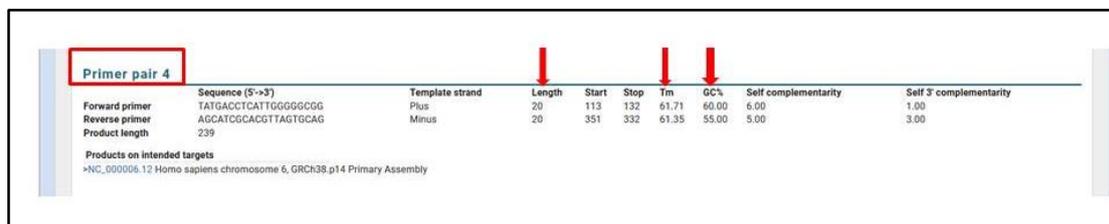


Figure 3.5. Primer pair 4.

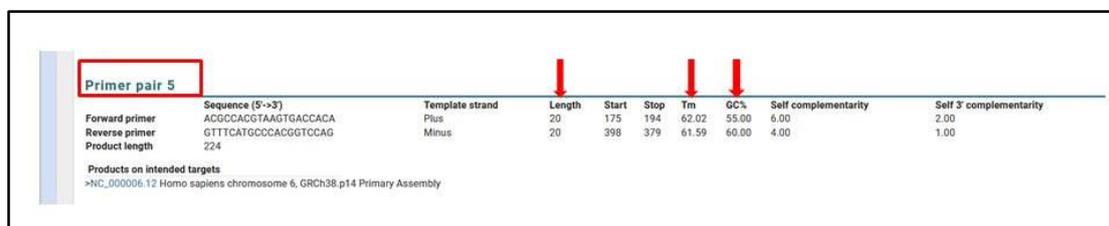


Figure 3.6. Primer pair 5.

Le tableau 3.1 regroupe les caractéristiques des 5 paires d'amorces choisies.

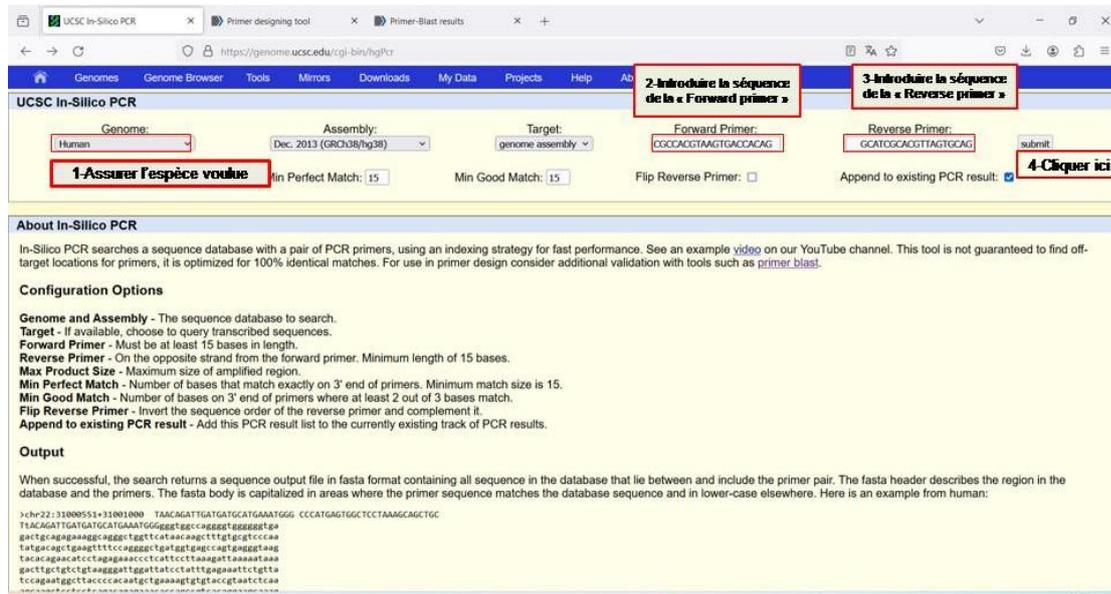
Tableau 3.1. La comparaison entre les critères d'une bonne amorce et nos amorces

Paires d'amorce	Les critères						
	Longueur (Lengh)		Température de fusion (Tm)		Teneur en GC(GC%)		Produit spécifique
	Taux optimale						
	18 à 24 bases		56 et 62° C		40 et 60%		Inférieur à 1000 Pb
	Amorce sens	Amorce anti-sens	Amorce sens	Amorce anti-sens	Amorce sens	Amorce anti-sens	
1	20	19	61.28	59.89	60	57	175
2	19	21	60.30	59.94	57.89	52.38	180
3	19	21	60.30	59.93	57.89	47.62	239
4	20	20	61.71	61.35	60	55	239
5	20	20	62.02	61.59	55	60	224

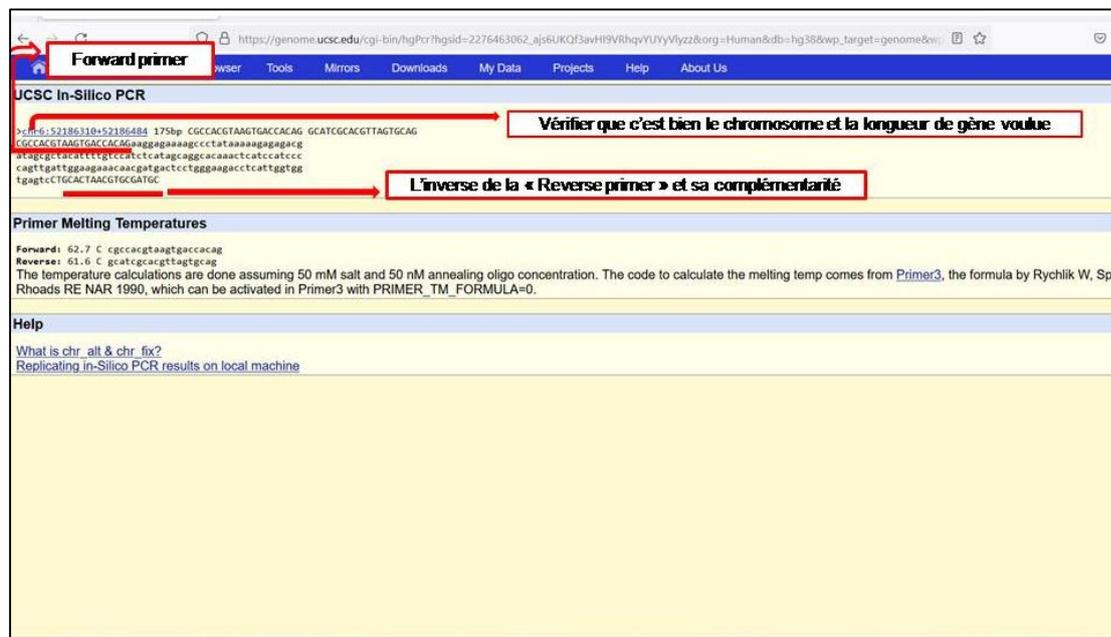


## Chapitre 3. Résultats

chromosome 6 porteur du gène *IL-17A*, la séquence des amorces et la température d'hybridation (Figures 3.7 et 3.8).



**Figure 3.9. 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 3.10. Résultats de la confirmation.** Un seul résultat est affiché comme en dessus, vérifier si la taille et le chromosome sont les même que ceux du gène *IL-17A*.

## **Chapitre 4. Conclusions et perspectives**

### **Chapitre 4. Conclusions et perspectives**

Les ILCs représentent une population de cellules immunitaires innées qui n'expriment pas des récepteurs spécifiques à l'antigène et jouent un rôle crucial dans la régulation de la réponse immunitaire innée et adaptative. À l'instar des cellules T auxiliaires (Th) CD4+, les ILC ont été divisées en différents sous-ensembles en fonction de leurs profils de cytokines, des facteurs de transcription exprimés et de leurs fonctions. Les ILC du groupe 1 comprennent des cellules cNK et ILC1s qui ont la capacité de produire des cytokines inflammatoires de type 1 notamment l'IFN- $\gamma$  et le facteur de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$ ). Les ILC du groupe 2 sont présentes dans la plupart de tissus barrières. Ces cellules produisent des cytokines de type TH2 telles que l'IL-13, l'IL-5 et l'IL-4 et dépendent du facteur de transcription GATA3 pour leur développement. Les ILCs du groupe 3 sont définis par l'expression du facteur de transcription ROR $\gamma$ t et se caractérisent par la sécrétion des cytokines de type TH17 en particulier l'IL-17 qui joue un rôle important dans la protection contre les infections bactériennes. L'analyse de l'expression de son taux par les ILC3s lors des infections bactériennes pourrait apporter des nouvelles perspectives dans les domaines de la thérapie et du diagnostic.

Ce travail a consisté à élaborer des amorces qui vont être utilisées pour la réalisation de la PCR afin de caractériser les sous populations des ILCs impliquées dans la défense de l'hôte contre les infections bactériennes. Ce travail, nous a permis de s'initier dans l'utilisation des outils de la bioinformatique et de se familiariser à plusieurs bases de données.

### Chapitre 5. Bibliographie

Abel, Alex M., Chao Yang, Monica S. Thakar, et Subramaniam Malarkannan. 2018. « Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization ». *Frontiers in Immunology* 9 (août): 1869. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01869>.

Almeida, F.F., et G.T. Belz. 2016a. « Innate Lymphoid Cells: Models of Plasticity for Immune Homeostasis and Rapid Responsiveness in Protection ». *Mucosal Immunology* 9 (5): 1103-12. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.64>.

———. 2016b. « Innate Lymphoid Cells: Models of Plasticity for Immune Homeostasis and Rapid Responsiveness in Protection ». *Mucosal Immunology* 9 (5): 1103-12. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.64>.

Asma, Syeda Tasmia, Kálmán Imre, Adriana Morar, Viorel Herman, Ulas Acaroz, Hamid Mukhtar, Damla Arslan-Acaroz, Syed Rizwan Ali Shah, et Robin Gerlach. 2022. « An Overview of Biofilm Formation–Combating Strategies and Mechanisms of Action of Antibiofilm Agents ». *Life* 12 (8): 1110. <https://doi.org/10.3390/life12081110>.

Barbier, François, et Michel Wolff. 2010. « Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa*: Vers l'impasse thérapeutique ? » *médecine/sciences* 26 (11): 960-68. <https://doi.org/10.1051/medsci/20102611960>.

Bayes, Hannah K., Neil D. Ritchie, et Thomas J. Evans. 2016. « Interleukin-17 Is Required for Control of Chronic Lung Infection Caused by *Pseudomonas Aeruginosa* ». Édité par B. A. McCormick. *Infection and Immunity* 84 (12): 3507-16. <https://doi.org/10.1128/IAI.00717-16>.

Ben Haj Khalifa, Anis, Didier Moissenet, Hoang Vu Thien, et Mohamed Khedher. 2011. « Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation ». *Annales de biologie clinique* 69 (4): 393-403. <https://doi.org/10.1684/abc.2011.0589>.

Castillo-González, Raquel, Ana Valle-Noguera, Maria José Gomez-Sánchez, Pu Xia, et Aranzazu Cruz-Adalia. 2022. « Innate lymphoid cells type 3 in cancer ». *Frontiers in Immunology* 13 (octobre): 1033252. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1033252>.

Chen, Kong, et Jay K. Kolls. 2017. « Interleukin-17A (IL17A) ». *Gene* 614 (mai): 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.01.016>.

## Chapitre 5. Bibliographie

---

Chen, Shenghui, Huiping Fan, Chenrui Ran, Yun Hong, Huixiong Feng, Zirui Yue, Hao Zhang, Pierre Pontarotti, Anlong Xu, et Shengfeng Huang. 2024. « The IL-17 Pathway Intertwines with Neurotrophin and TLR/IL-1R Pathways since Its Domain Shuffling Origin ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 121 (19): e2400903121. <https://doi.org/10.1073/pnas.2400903121>.

Crinier, Adeline, Charlotte Viant, Mathilde Girard-Madoux, et Éric Vivier. 2017. « Les cellules lymphoïdes innées ». *médecine/sciences* 33 (5): 534-42. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173305018>.

Cypowyj, Sophie, et Éric Vivier. 2016. « Les cellules innées lymphoïdes : des nouveaux acteurs de l'immunité ». *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* 200 (3): 561-74. [https://doi.org/10.1016/S0001-4079\(19\)30732-0](https://doi.org/10.1016/S0001-4079(19)30732-0).

De Sousa, Telma, Michel Hébraud, Maria L. N. Enes Dapkevicius, Luís Maltez, José Eduardo Pereira, Rosa Capita, Carlos Alonso-Calleja, Gilberto Igrejas, et Patricia Poeta. 2021a. « Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in *Pseudomonas Aeruginosa* ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (23): 12892. <https://doi.org/10.3390/ijms222312892>.

———. 2021b. « Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in *Pseudomonas Aeruginosa* ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (23): 12892. <https://doi.org/10.3390/ijms222312892>.

Diggle, Stephen P., et Marvin Whiteley. 2020a. « Microbe Profile: *Pseudomonas Aeruginosa*: Opportunistic Pathogen and Lab Rat: This Article Is Part of the Microbe Profiles Collection. » *Microbiology* 166 (1): 30-33. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000860>.

———. 2020b. « Microbe Profile: *Pseudomonas Aeruginosa*: Opportunistic Pathogen and Lab Rat: This Article Is Part of the Microbe Profiles Collection. » *Microbiology* 166 (1): 30-33. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000860>.

Domingues, Rita G., et Matthew R. Hepworth. 2020. « Immunoregulatory Sensory Circuits in Group 3 Innate Lymphoid Cell (ILC3) Function and Tissue Homeostasis ». *Frontiers in Immunology* 11 (février): 116. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00116>.

Elemam, Noha, Suad Hannawi, et Azzam Maghazachi. 2017. « Innate Lymphoid Cells (ILCs) as Mediators of Inflammation, Release of Cytokines and Lytic Molecules ». *Toxins* 9 (12): 398. <https://doi.org/10.3390/toxins9120398>.

## Chapitre 5. Bibliographie

---

Filloux, Alain, et Isabelle Vallet. 2003. « Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne ». *médecine/sciences* 19 (1): 77-83. <https://doi.org/10.1051/medsci/200319177>.

Forkel, Marianne, et Jenny Mjösberg. 2016. « Dysregulation of Group 3 Innate Lymphoid Cells in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease ». *Current Allergy and Asthma Reports* 16 (10): 73. <https://doi.org/10.1007/s11882-016-0652-3>.

Gaffen, Sarah L. 2008. « An Overview of IL-17 Function and Signaling ». *Cytokine* 43 (3): 402-7. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.07.017>.

Garcia, Magali, Eric Morello, Julien Garnier, Christine Barrault, Martine Garnier, Christophe Burucoa, Jean-Claude Lecron, Mustapha Si-Tahar, François-Xavier Bernard, et Charles Bodet. 2018. « *Pseudomonas Aeruginosa* Flagellum Is Critical for Invasion, Cutaneous Persistence and Induction of Inflammatory Response of Skin Epidermis ». *Virulence* 9 (1): 1163-75. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1480830>.

Garcia-Vello, Pilar, Flaviana Di Lorenzo, Daniele Zucchetta, Alla Zamyatina, Cristina De Castro, et Antonio Molinaro. 2022. « Lipopolysaccharide Lipid A: A Promising Molecule for New Immunity-Based Therapies and Antibiotics ». *Pharmacology & Therapeutics* 230 (février): 107970. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107970>.

Garibyan, Lilit, et Nidhi Avashia. 2013. « Polymerase Chain Reaction ». *Journal of Investigative Dermatology* 133 (3): 1-4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>.

Ge, Yun, Man Huang, et Yong-ming Yao. 2020. « Biology of Interleukin-17 and Its Pathophysiological Significance in Sepsis ». *Frontiers in Immunology* 11 (juillet): 1558. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01558>.

Jin, Tengchuan, et Qian Yin, éd. 2019. *Structural Immunology*. Vol. 1172. Advances in Experimental Medicine and Biology. Singapore: Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-9367-9>.

Kadri, Karim. 2020. « Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications ». In *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*, édité par Madan L. Nagpal, Oana-Maria Boldura, Cornel Baltă, et Shymaa Enany. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86491>.

## Chapitre 5. Bibliographie

---

Kida, Yutaka, Yuichiro Higashimoto, Hiroyoshi Inoue, Takashi Shimizu, et Koichi Kuwano. 2008. « A Novel Secreted Protease from *Pseudomonas Aeruginosa* Activates NF- $\kappa$ B through Protease-Activated Receptors ». *Cellular Microbiology* 10 (7): 1491-1504. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01142.x>.

Laborda, Pablo, José Luis Martínez, et Sara Hernando-Amado. 2022. « Evolution of Habitat-Dependent Antibiotic Resistance in *Pseudomonas Aeruginosa* ». Édité par Monica Adriana Garcia-Solache. *Microbiology Spectrum* 10 (4): e00247-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00247-22>.

Liao, Chongbing, Xin Huang, Qingxia Wang, Dan Yao, et Wuyuan Lu. 2022a. « Virulence Factors of *Pseudomonas Aeruginosa* and Antivirulence Strategies to Combat Its Drug Resistance ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12 (juillet): 926758. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.926758>.

———. 2022b. « Virulence Factors of *Pseudomonas Aeruginosa* and Antivirulence Strategies to Combat Its Drug Resistance ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12 (juillet): 926758. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.926758>.

Lister, Philip D., Daniel J. Wolter, et Nancy D. Hanson. 2009. « Antibacterial-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms ». *Clinical Microbiology Reviews* 22 (4): 582-610. <https://doi.org/10.1128/CMR.00040-09>.

Liu, Meifang, et Cai Zhang. 2017. « The Role of Innate Lymphoid Cells in Immune-Mediated Liver Diseases ». *Frontiers in Immunology* 8 (juin): 695. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00695>.

Liu, Shenping, Xi Song, Boris A. Chrnyk, Suman Shanker, Lise R. Hoth, Eric S. Marr, et Matthew C. Griffor. 2013. « Crystal Structures of Interleukin 17A and Its Complex with IL-17 Receptor A ». *Nature Communications* 4 (1): 1888. <https://doi.org/10.1038/ncomms2880>.

Lopez, D., H. Vlamakis, et R. Kolter. 2010. « Biofilms ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (7): a000398-a000398. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000398>.

Lorè, Nicola I., Kong Chen, et Katarzyna Bulek. 2021. « Editorial: The IL-17 Cytokine Family in Tissue Homeostasis and Disease ». *Frontiers in Immunology* 12 (février): 641986. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.641986>.

## Chapitre 5. Bibliographie

---

Lorenz, Todd C. 2012. « Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies ». *Journal of Visualized Experiments*, n° 63 (mai): 3998. <https://doi.org/10.3791/3998>.

Maldonado, Rita F., Isabel Sá-Correia, et Miguel A. Valvano. 2016. « Lipopolysaccharide Modification in Gram-Negative Bacteria during Chronic Infection ». Édité par Chris Whitfield. *FEMS Microbiology Reviews* 40 (4): 480-93. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw007>.

Mattick, John S., Cynthia B. Whitchurch, et Richard A. Alm. 1996. « The Molecular Genetics of Type-4 Fimbriae in *Pseudomonas Aeruginosa* - a Review ». *Gene* 179 (1): 147-55. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(96\)00441-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00441-6).

Mazgaeen, Lalita, et Prajwal Gurung. 2020. « Recent Advances in Lipopolysaccharide Recognition Systems ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (2): 379. <https://doi.org/10.3390/ijms21020379>.

Mazzurana, L., A. Rao, A. Van Acker, et J. Mjösberg. 2018. « The Roles for Innate Lymphoid Cells in the Human Immune System ». *Seminars in Immunopathology* 40 (4): 407-19. <https://doi.org/10.1007/s00281-018-0688-7>.

Michalska, Marta, et Philipp Wolf. 2015. « *Pseudomonas* Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing ». *Frontiers in Microbiology* 6 (septembre). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00963>.

Mielko, Karolina Anna, Sławomir Jan Jabłoński, Justyna Milczewska, Dorota Sands, Marcin Łukaszewicz, et Piotr Młynarz. 2019. « Metabolomic Studies of *Pseudomonas Aeruginosa* ». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 35 (11): 178. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2739-1>.

Mills, Kingston H. G. 2023. « IL-17 and IL-17-Producing Cells in Protection versus Pathology ». *Nature Reviews Immunology* 23 (1): 38-54. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00746-9>.

Milovanovic, Jelena, Aleksandar Arsenijevic, Bojana Stojanovic, Tatjana Kanjevac, Dragana Arsenijevic, Gordana Radosavljevic, Marija Milovanovic, et Nebojsa Arsenijevic. 2020. « Interleukin-17 in Chronic Inflammatory Neurological Diseases ». *Frontiers in Immunology* 11 (juin): 947. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00947>.

## Chapitre 5. Bibliographie

---

Miossec, Pierre. 2016. « Interleukine 17 et l'inflammation chronique : de la découverte au ciblage thérapeutique ». *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* 200 (4-5): 933-42. [https://doi.org/10.1016/S0001-4079\(19\)30685-5](https://doi.org/10.1016/S0001-4079(19)30685-5).

———. 2017. « Update on Interleukin-17: A Role in the Pathogenesis of Inflammatory Arthritis and Implication for Clinical Practice ». *RMD Open* 3 (1): e000284. <https://doi.org/10.1136/rmdopen-2016-000284>.

Morand, A., et J.-J. Morand. 2017. « Pseudomonas aeruginosa en dermatologie ». *Annales de Dermatologie et de Vénérologie* 144 (11): 666-75. <https://doi.org/10.1016/j.annder.2017.06.015>.

Nies, Jasper F., et Ulf Panzer. 2020. « IL-17C/IL-17RE: Emergence of a Unique Axis in TH17 Biology ». *Frontiers in Immunology* 11 (février): 341. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00341>.

Onishi, Reiko M., et Sarah L. Gaffen. 2010. « Interleukin-17 and Its Target Genes: Mechanisms of Interleukin-17 Function in Disease ». *Immunology* 129 (3): 311-21. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03240.x>.

O'Shea, John J., Massimo Gadina, et Richard Siegel. 2013. « Cytokines and Cytokine Receptors ». In *Clinical Immunology*, 108-35. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7234-3691-1.00033-7>.

Papadopoulos, Athanasios, Max Busch, Jens Reiners, Eymen Hachani, Miriam Baeumers, Julia Berger, Lutz Schmitt, et al. 2022. « The periplasmic chaperone Skp prevents misfolding of the secretory lipase A from Pseudomonas aeruginosa ». *Frontiers in Molecular Biosciences* 9 (octobre): 1026724. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.1026724>.

Peix, Alvaro, Martha-Helena Ramírez-Bahena, et Encarna Velázquez. 2009. « Historical Evolution and Current Status of the Taxonomy of Genus Pseudomonas ». *Infection, Genetics and Evolution* 9 (6): 1132-47. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.08.001>.

Pina-Sánchez, Manuel, Marta Rúa, et José Luis Del Pozo. 2023. « Present and future of resistance in Pseudomonas aeruginosa: implications for treatment ». *Revista Española de Quimioterapia* 36 (Suppl1): 54-58. <https://doi.org/10.37201/req/s01.13.2023>.

Poole, Keith. 2011. « Pseudomonas Aeruginosa: Resistance to the Max ». *Frontiers in Microbiology* 2. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00065>.

## Chapitre 5. Bibliographie

---

Qin, Shugang, Wen Xiao, Chuanmin Zhou, Qinqin Pu, Xin Deng, Lefu Lan, Haihua Liang, Xiangrong Song, et Min Wu. 2022a. « Pseudomonas Aeruginosa: Pathogenesis, Virulence Factors, Antibiotic Resistance, Interaction with Host, Technology Advances and Emerging Therapeutics ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 7 (1): 199. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01056-1>.

———. 2022b. « Pseudomonas Aeruginosa: Pathogenesis, Virulence Factors, Antibiotic Resistance, Interaction with Host, Technology Advances and Emerging Therapeutics ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 7 (1): 199. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01056-1>.

Rasamiravaka, Tsiry, Quentin Labtani, Pierre Duez, et Mondher El Jaziri. 2015. « The Formation of Biofilms by *Pseudomonas Aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms ». *BioMed Research International* 2015: 1-17. <https://doi.org/10.1155/2015/759348>.

Reynolds, Dan, et Marin Kollef. 2021a. « The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of Pseudomonas Aeruginosa Infections: An Update ». *Drugs* 81 (18): 2117-31. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01635-6>.

———. 2021b. « The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of Pseudomonas Aeruginosa Infections: An Update ». *Drugs* 81 (18): 2117-31. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01635-6>.

Rhee, Sang Hoon. 2014. « Lipopolysaccharide: Basic Biochemistry, Intracellular Signaling, and Physiological Impacts in the Gut ». *Intestinal Research* 12 (2): 90. <https://doi.org/10.5217/ir.2014.12.2.90>.

Rossi, Elio, Melanie Ghoul, et Ruggero La Rosa. 2022. « Editorial: Pseudomonas aeruginosa Pathogenesis: Virulence, Antibiotic Tolerance and Resistance, Stress Responses and Host-Pathogen Interactions ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12 (février): 860314. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.860314>.

Ruiz De Morales, José María G., Lluís Puig, Esteban Daudén, Juan D. Cañete, José Luis Pablos, Antonio Oliveira Martín, Carlos González Juanatey, et al. 2020. « Critical Role of Interleukin (IL)-17 in Inflammatory and Immune Disorders: An Updated Review of the Evidence Focusing in Controversies ». *Autoimmunity Reviews* 19 (1): 102429. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2019.102429>.

Sedgwick, Alexander James, Nazanin Ghazanfari, Patrick Constantinescu, Theo Mantamadiotis, et Alexander David Barrow. 2020. « The Role of NK Cells and Innate Lymphoid Cells in Brain Cancer ». *Frontiers in Immunology* 11 (juillet): 1549. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01549>.

Shafeeq, Noorhan Khalid. 2021. « Polymer Chain Reaction (PCR): Principle and Applications ». *Ibn AL- Haitham Journal For Pure and Applied Sciences* 34 (4): 35-44. <https://doi.org/10.30526/34.4.2699>.

Simoni, Yannick, et Evan W. Newell. 2018. « Dissecting Human ILC Heterogeneity: More than Just Three Subsets ». *Immunology* 153 (3): 297-303. <https://doi.org/10.1111/imm.12862>.

## Chapitre 5. Bibliographie

---

- Spits, Hergen, Jochem H Bernink, et Lewis Lanier. 2016. « NK Cells and Type 1 Innate Lymphoid Cells: Partners in Host Defense ». *Nature Immunology* 17 (7): 758-64. <https://doi.org/10.1038/ni.3482>.
- Sunaga, Shogo, Junya Tsunoda, Toshiaki Teratani, Yohei Mikami, et Takanori Kanai. 2022. « Heterogeneity of ILC2s in the Intestine; Homeostasis and Pathology ». *Frontiers in Immunology* 13 (mai): 867351. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.867351>.
- Thi, Minh Tam Tran, David Wibowo, et Bernd H.A. Rehm. 2020a. « Pseudomonas Aeruginosa Biofilms ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (22): 8671. <https://doi.org/10.3390/ijms21228671>.
- . 2020b. « Pseudomonas Aeruginosa Biofilms ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (22): 8671. <https://doi.org/10.3390/ijms21228671>.
- Thiam, Fatou, Gora Diop, Cedric Coulonges, Celine Derbois, Alassane Thiam, Abou Abdallah Malick Diouara, Mame Ndew Mbaye, et al. 2024. « An Elevated Level of Interleukin-17A in a Senegalese Malaria Cohort Is Associated with Rs8193038 IL-17A Genetic Variant ». *BMC Infectious Diseases* 24 (1): 275. <https://doi.org/10.1186/s12879-024-09149-8>.
- Van Alst, Nadine E., Melanie Wellington, Virginia L. Clark, Constantine G. Haidaris, et Barbara H. Iglewski. 2009. « Nitrite Reductase NirS Is Required for Type III Secretion System Expression and Virulence in the Human Monocyte Cell Line THP-1 by *Pseudomonas Aeruginosa* ». *Infection and Immunity* 77 (10): 4446-54. <https://doi.org/10.1128/IAI.00822-09>.
- Wages, J.M. 2005. « POLYMERASE CHAIN REACTION ». In *Encyclopedia of Analytical Science*, 243-50. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00475-1>.
- Wilderman, Paula J., Adriana I. Vasil, Zaiga Johnson, Megan J. Wilson, Heather E. Cunliffe, Iain L. Lamont, et Michael L. Vasil. 2001. « Characterization of an Endoprotease (PrpL) Encoded by a PvdS-Regulated Gene in *Pseudomonas Aeruginosa* ». Édité par J. T. Barbieri. *Infection and Immunity* 69 (9): 5385-94. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.9.5385-5394.2001>.
- Xie, Mengying, Mingying Zhang, Mengyuan Dai, Shan Yue, Zhao Li, Ju Qiu, Chenqi Lu, et Wei Xu. 2022. « IL-18/IL-18R Signaling Is Dispensable for ILC Development But Constrains the Growth of ILCP/ILCs ». *Frontiers in Immunology* 13 (juillet): 923424. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.923424>.
- Zenobia, Camille, et George Hajishengallis. 2015. « Basic Biology and Role of Interleukin-17 in Immunity and Inflammation ». *Periodontology 2000* 69 (1): 142-59. <https://doi.org/10.1111/prd.12083>.
- Zhang, Xiaoping, Pornpimon Angkasekwinai, Chen Dong, et Hong Tang. 2011. « Structure and Function of Interleukin-17 Family Cytokines ». *Protein & Cell* 2 (1): 26-40. <https://doi.org/10.1007/s13238-011-1006-5>.
- Apte, Arun, et Saurabha Daniel. 2009. « PCR Primer Design ». *Cold Spring Harbor Protocols* 2009 (3): pdb.ip65. <https://doi.org/10.1101/pdb.ip65>.
- Bustin, Stephen A., Reinhold Mueller, et Tania Nolan. 2020. « Parameters for Successful PCR Primer Design ». In *Quantitative Real-Time PCR*, édité par Roberto Biassoni et

## Chapitre 5. Bibliographie

---

Alessandro Raso, 2065:5-22. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9833-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9833-3_2).

Lorenz, Todd C. 2012. « Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies ». *Journal of Visualized Experiments*, n° 63 (mai), 3998. <https://doi.org/10.3791/3998>.

O'Halloran, Damien M. 2016. « PrimerMapper: High Throughput Primer Design and Graphical Assembly for PCR and SNP Detection ». *Scientific Reports* 6 (1): 20631. <https://doi.org/10.1038/srep20631>.

Rahman, H. Ur, X. Yue, Q. Yu, W. Zhang, Q. Zhang, et P. Li. 2020. « Current PCR-based methods for the detection of mycotoxigenic fungi in complex food and feed matrices ». *World Mycotoxin Journal* 13 (2): 139-50. <https://doi.org/10.3920/WMJ2019.2455>.

## Résumé

**Introduction :** Les cellules lymphoïdes innées (ILC, *Innate lymphoid cells*) sont des cellules qui font partie de la première ligne de défense contre les infections notamment les infections bactériennes. Ces cellules présentent une grande diversité de facteurs de transcription et produisent une gamme de cytokines impliquées dans certaines réponses immunitaires anti-inflammatoires et anti-infectieuses. L'IL-17 est une cytokine pro-inflammatoire produites principalement par les ILC3s et joue un rôle important dans les défenses contre les infections bactériennes.

**Objectif :** concevoir des séquences d'oligonucléotides qui serviront d'amorces pour amplifier le gène *IL-17A* par PCR.

**Matériel et méthodes :** nous avons utilisé la bio-informatique pour élaborer des amorces spécifiques du gène *IL-17A*. La séquence du gène *IL-17A* a été obtenue grâce à la base de données « Ensembl », tandis que les amorces ont été conçues à l'aide de l'outil « Primer-BLAST » du site NCBI. Les résultats ont été confirmés par PCR *in silico*.

**Résultats :** plusieurs paires d'amorces spécifiques présentent des caractéristiques optimales pour le bon déroulement d'une PCR ont été choisies.

**Conclusion :** La conception de bonnes d'amorces permet de réussir la technique PCR et par la suite amplifier le gène *IL-17A* et étudier son rôle lors de l'infection par *P. aeruginosa*.

**Mots clé :** ILC3, *IL-17A*, *P. aeruginosa*, Primer-BLAST, amorces.

## Abstract

**Introduction:** Innate lymphoid cells (ILC) are cells that are part of the first line of defence against infections, particularly bacterial infections. These cells display a wide diversity of transcription factors and produce a range of cytokines involved in certain anti-inflammatory and anti-infectious immune responses. IL-17 is a pro-inflammatory cytokine produced mainly by ILC3s and plays an important role in defences against bacterial infections.

**Objective:** design oligonucleotide sequences that will serve as primers to amplify the *IL-17A* gene by PCR.

**Material and methods:** we used bioinformatics to develop specific primers for the *IL-17A* gene. The *IL-17A* gene sequence was obtained using the "Ensembl" database, while the primers were designed using the "Primer-BLAST" tool on the NCBI website. The results were confirmed by *in silico* PCR.

**Results:** several pairs of specific primers presenting optimal characteristics for the smooth running of a PCR were chosen.

**Conclusion:** The design of good primers allows the PCR technique to be successful and subsequently to amplify the *IL-17A* gene and study its role during *P. aeruginosa* infection.

**Key words:** ILC3, *IL-17A*, *P. aeruginosa*, Primer-BLAST, primers.

## ملخص

**مقدمة:** الخلايا اللمفاوية الفطرية (ILC) هي الخلايا التي تشكل جزءاً من خط الدفاع الأول ضد الالتهابات، وخاصة الالتهابات البكتيرية. تعرض هذه الخلايا مجموعة واسعة من عوامل النسخ وتنتج مجموعة من السيتوكينات المشاركة في بعض الاستجابات المناعية المضادة للالتهابات والمضادة للعدوى IL-17. هو سيتوكين مؤيد للالتهابات يتم إنتاجه بشكل رئيسي بواسطة ILC3s ويلعب دوراً مهماً في الدفاعات ضد الالتهابات البكتيرية.

**الهدف:** تصميم تسلسلات قليل النوكليوتيد التي ستكون بمثابة بادئات لتضخيم جين *IL-17A* بواسطة PCR.

**المواد والطرق:** استخدمنا أدوات المعلوماتية الحيوية لتطوير بادئات محددة لجين *IL-17A*. تم الحصول على تسلسل الجينات *IL-17A* باستخدام قاعدة بيانات "Ensembl"، في حين تم تصميم الأشعال باستخدام أداة "Primer-BLAST" على موقع NCBI. تم تأكيد النتائج بواسطة PCR *in silico*.

**النتائج:** تم اختيار عدة أزواج من البادئات المحددة التي تقدم الخصائص المثلى للتشغيل السلس لـ PCR.

**الخلاصة:** إن تصميم البادئات الجيدة يسمح لتقنية PCR بالنجاح ومن ثم تضخيم جين *IL-17A* ودراسة دوره أثناء الإصابة بـ *P. aeruginosa*.

**الكلمات المفتاحية:** ILC3، *IL-17A*، *P. aeruginosa*، Primer-BLAST، بادئات.