



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur

et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE de TLEMCEM

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences

de la Terre et de l'Univers

Département Biologie

Laboratoire de biologie moléculaire et immunologie



MEMOIRE

Présenté par

El helali Nadjat

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Immunologie

Intitule :

**Interleukine 4 et profil anti inflammatoire au cours de l'asthme
allergique pédiatrique**

Sous la direction de Docteur Chahrazede El mezouar

Soutenu le 09-09-2020, devant le jury composé de :

Président	ARIBI Mourad	Professeur	Université de Tlemcen
Examineur	NOUARI Wafa	MCB	Université de Tlemcen

Année universitaire 2019/2020

Dédicace

Premièrement, je remercie beaucoup Dieu pour mon succès au cours de ma carrière universitaire et pour avoir terminé ce travail....

Et je dédie ce travail à la personne qui m'a toujours soutenu et accompagné, à celle qui a changé toute sa vie pour ma propre réussite, à mon cher père, que Dieu ait pitié de lui ...

À ma famille qui m'a soutenu, ma mère, mes frères et sœurs ...

Et mes collègues d'études de la promotion d'immunologie sans exception ...

À mes amies : Amina, Iman, Asma, Cherifa, Shaima et Hafsa Merci de vous tenir par moi

Ensuite, j'adresse mes remerciements particuliers à mes professeurs depuis mon premier jour de fac ...

Et à tous ceux qui m'ont soutenu ...

TABLES DES MATIERS

Introduction.....	1
Revue de la littérature.....	3
1. Asthme.....	3
2. Asthme allergique pédiatrique.....	4
2.1. Généralité.....	4
2.2. Causes.....	5
2.2.1. Causes environnementales.....	5
2.2.1.1. L'allergie aux pollens.....	5
2.2.1.2. Les acariens domestiques.....	5
2.2.1.3. Les animaux domestiques.....	6
2.2.1.4. Tabagisme.....	6
2.2.2. Causes génétiques.....	6
2.3. Epidémiologie.....	6
2.4. Diagnostique.....	8
2.5. Crises d'asthme.....	8
2.6. Processus immunologique.....	9
2.7. Traitement et contrôle de l'asthme.....	9
3. Asthme et microbiote intestinale.....	12
3.1. Généralité.....	12
3.2. Hache intestin_poumons.....	13
3.3. Microbiote et cellules immunitaire.....	13
3.3.1. T reg.....	13
3.3.2. Th17.....	13
3.3.3. iNKT.....	14
3.3.4. Les cellules dendritiques.....	14
3.4. Résultats de l'examen systématique.....	14
4. Interleukine 4.....	17
4.1. Généralité.....	17
4.2. Récepteur.....	18
4.3. Gène.....	18
4.4. Signalisation.....	19
4.5. Profile anti inflammatoire (IL_4) au cours d'asthme allergique.....	19
5. PCR (Polymérase Chaîne Réaction).....	20
5.1. Définition.....	20
5.2. Principe.....	20

5.3.	Les étapes de PCR.....	20
5.4.	Les acteurs de PCR.....	21
5.4.1.	L'ADN.....	21
5.4.2.	Les amorces, sens et anti sens.....	21
5.4.3.	Taq polymérase.....	21
5.4.4.	Les nucléotides.....	21
5.5.	Choix des amorces.....	21
5.5.1.	La spécificité.....	21
5.5.2.	Les outils.....	21
5.5.3.	Les caractéristiques d'une bonne pair d amorces.....	22
	Matériels et methods.....	23
1.	Conception des amorces.....	23
2.	Sélection des amorces.....	23
2.1.	La spécificité.....	23
2.2.	La longueur d amorces « oligonucléotides ».....	24
2.3.	La température de fusion.....	24
2.4.	La teneur en GC.....	24
2.5.	La séquence à l'extrémité 3'.....	24
3.	La recherche de la séquence de référence du gène d Interleukine 4.....	24
4.	Le design primer.....	26
	Interprétations des résultats.....	27
1.	Résultats de conception des amorces « Primer Blast ».....	27
2.	Interprétation des résultats.....	27
3.	Confirmation des résultats.....	28
4.	Perspectives.....	29
	Discussion.....	30
1.	Discussion.....	30
	Conclusion.....	31
	Références bibliographiques.....	32

LISTE DES TABLEAUX :

Tableau 1.1 : Mécanismes et caractéristiques pathologiques et immuno pathologiques d'asthme (Russell et Brighthing, 2017).

Tableaux 1.2 : Différents gènes susceptibles dans l'asthme allergique pédiatrique.

Tableau 1.3 : Les critères de planification de traitement et de contrôle d'asthme.

Tableau 1.4 : La stratégie de traitement et de contrôle d'asthme selon ces différents stades d'après GINA 2020.

Tableau 1.5 : Les doses des corticoïdes prescrit par le praticien pour les enfants asthmatiques âgés de 6 à 11 ans.

Tableau 1.6 : Résultats des études d'association des bactéries de microbiote intestinale et la sensibilisation allergique et l'asthme chez les enfants.

Tableau 1.7 : Propriétés d'interleukine 4 (J.Banchereau, 1990).

Tableau 3.1: Une comparaison entre l'amorce obtenus et les amorces idéal pour un PCR.

Tableau 4.1 : L'étude des différentes amorces de gene d'interleukine 4 conçus par le Primer Blast pour la technique de PCR (Rt-PCR).

LISTE DES FIGURES :

Figure 1.1 : L'asthme est un complexe des interactions gène-environnement entraînant relativement des symptômes.

Figure 1.2 : Pourcentage des enfants asthmatiques en % par âge dans le monde (d'après le CDC en 2016), (Zahran HS et al/2018), (Papie et al,2018).

Figure 1.3 : distribution des sujet atteints de l'asthme dans le monde selon le CDC.

Figure 1.4 : Mécanisme immuno-pathologique de l'asthme allergique éosinophiliques. (DC : cellule dendritiques, LB : lymphocytes B, IgE : immunoglobulines E, Th2 : lymphocytes T helper, Il_4,5,13 : interleukines 4,5,13, PGD2 : prostaglandine D2).

Figure 1.5 : Stratégie de traitement et contrôle de l'asthme selon la GINA 2020.

Figure 1.6 : Les deux types de récepteurs d interleukine 4.

Figure 1.7 : Le locus d interleukine 4 sur le chromosome 5 humain.

Figure 1.8 : Voie de signalisation induit par l'interleukine 4 et ses récepteurs.

Figure 1.9 : Les étapes de PCR.

Figure 2.1 : La séquence de gene codant l'interleukine 4 sur le site ensembl.org.

Figure 2.2 : La séquence de gene d interleukine 4 d intérêt copier dans un document Word.

Figure 2.3 : L'outil Primer blast.

Figure 2.4: La séquence de gene d il_4 copier sur le logiciel Primer blast.

Figure 3.1 : Résultats de conception des amorces par le Primer Blast.

Figure 3.2 : Site de confirmation des amorces In-Silico PCR.

Figure 3.3: Confirmation des résultats.

LISTE DES ABREVIATIONS :

NIH : National Institute of Health Guidance on Asthma
IgE : Immunoglobulines E
LB : Lymphocyte B
LT : Lymphocyte T
ORMDL3 : Orosomucoid-like 3
GSDMB : Gasdermin B
IL_4 : Interleukine 4
STAT6 : Signal Transducer and Activator of Transcription 6
GATA3 : Trans-acting T cell specific transcription factor 3
TLR2 : Toll-like receptor 2
CD14 : Cluster de la différenciation 14
GSTT : Glutathione S-transferase theta-1
IL_33 : Interleukine 33
MYB : Myeloblastosis gene
MPAR : Mycophenolic acid resistance gene
TNC : Tenascin C
COL29A1 : Collagen XXIX gene
CTNNA3 : Catenin alpha 3
CDC : Centre de Contrôle et de Prévention des Maladies
GINA : Global Initiative for Asthma
FEV1 : Forced expiratory volume in one second
FVC : Forced vital capacity
VEMS : Volume expiratoire maximal par seconde
Th2 : Lymphocytes T helper 2
DC : Cellule dendritique
IL_5 : Interleukine 5
IL_13 : Interleukine 13
PGD2 : Prostaglandine D2

ICS : Corticostéroïde inhalé
SABA : Short acting β_2 adrenergic receptor agonists
LTRA : Leucotriènes receptor antagonistes
LABA : Long acting β_2 adrenergic receptor agonists
OCS : Corticostéroïde orale
HFA : Hydrofluoroalkane propellant
DPI : Dry powder inhaler
T reg : Cellule T régulatrice
AGCC : Acide gras à chaîne courte
Th17 : Lymphocyte T helper 17
iNKT : Natural killer T cell
Th1 : Lymphocyte T helper 1
RT-PCR : Real time PCR
ARNr : Acide ribonucléique ribosomique
DGGE : Electrophorèse sur gel en gradient dénaturant
BCGF1 : B cell growth factor 1
BSF1 : B stem factor 1
Tcd4+ : Lymphocyte T cd4+
ILC2 : Cellule lymphoïde innée de type 2
Tfh : Lymphocyte folliculaire accessoire
IgG1 : Immunoglobuline G1
PCR : Polymérase chaîne réaction
ADN : Acide désoxyribonucléique
RAD50 : Double strand break repair protein 50
KIF3 α : Kinesin family member 3 A
JAK : Janus kinase
Mg : Magnésium
ADNc : ADN complémentaire
NCBI : National Center for Biotechnology Information
Tm : Melting temperature

Résumé :

l'asthme allergique pédiatrique est un trouble respiratoire, pendant lequel l'exposition a un allergène induit a une réponse immunitaire via un profile anti inflammatoire provoquant la sécrétion de l'interleukine 4 , l'expression de cette cytokine fait l'objet de plusieurs études, dont l'utilisation des méthodes de la biologie moléculaire tels que la technique de la PCR est considérée comme un étape essentiel pour réaliser ces études, le choix des bonnes pairs d amorces pour la réaction (PCR) par la conception des amorces est une étape non négligeable afin d'effectuer l'étude.

Mots clés :

Asthme allergique, interleukine 4, PCR, conceptions d amorces.

Abstract:

Pediatric allergic asthma is a respiratory disorder, during which the exposure to an allergen induces an immune response using an anti-inflammatory profile causing the secretion of interleukin-4, the expression of this cytokine is the subject of several studies , of which the use of molecular biology methods such as the PCR technique is considered an essential step in performing these studies, the choice of the right primer pairs for the reaction (PCR) by the design of the primers is a step important to conduct the study.

Key words:

Allergic asthma, interleukin 4, PCR, primer design.

Introduction

L'asthme allergique est un trouble inflammatoire chronique des voies respiratoire caractérisé par une inflammation locale et une hyperréactivité, les symptômes comprennent une respiration sifflante, une toux, une oppression thoracique, et des épisodes d'exacerbations récurrents de la respiration soufflante et d'une bronchoconstriction, d'ou plus de 300 millions personnes dans le monde souffrant d'asthme (Finotto, 2019), dont l'asthme allergique est probablement le phénotype le plus courant dans la population générale des patients asthmatiques caractérisé par la présence d'une sensibilisation aux allergènes environnementaux, une éosinophilie du sang périphérique est observée pour laquelle des réponses Th2 sont polarisées, et des cytokines de Th2 (IL_4, 5 et 13) ont été signalées dans le sang des sujets souffrants d'asthme allergique (Schatz and Rosenwasser, 2014).

L'interleukine 4 est la principale cytokine anti inflammatoire impliquée dans la prolifération cellulaire, et l'expression de divers gènes lors de la fixation sur son récepteur (Ul-Haq et al, 2016), est une cytokine de type 1 avec un poids moléculaire environ 20 Kda qui partage des similitudes avec l'interleukine 13, produit par les cellules Tcd 4+, les Tcd 8+, les ILC2, les basophiles, les mastocytes et les éosinophiles, dans les lymphocytes B l'interleukine 4 induit a une commutation isotypique et une production des IgE et des IgG1 (Sequeida et al, 2017).

L'expression d'interleukine 4 joue un rôle important dans la progression d'un certain nombre des maladies bien que l'asthme allergique, il y a aussi les tumeurs solides, la leucémie a cellules B (Ul-Haq et al, 2016).

L'expression d'interleukine 4 est codée par le gène *IL_4* situé sur le bras long de chromosome 5q23.31 chez l'homme, situé entre les gènes de RAD50 et KIF3 α (Paul, 2015), dont l'étude de l'expression de ce gène par les techniques de la biologie moléculaire permet de fournir des nouvelles méthodes pour diagnostiquer, évaluer, contrôler et traiter l'asthme allergique particulièrement chez la tranche la plus jeune des gens asthmatiques.

Actuellement, il est difficile d'imaginer une étude biologique moléculaire qui n'inclut pas la PCR. Cette technique innovante a été rapportée pour la première fois par Saiki et al en 1985, et Mullis et Faloona en 1987 pour amplifier la séquence du génome de la β -globine pour le diagnostic de la drépanocytose.

Il a été démontré que la PCR amplifiait de manière exponentielle et à l'aide d'un thermocycleur des séquences cibles en utilisant des amorces Oligo nucléotidiques conçus par un logiciel de la conception des amorces (Matsuda, 2017).

Cela fait l'objectif de notre étude, de concevoir les bonnes paires d'amorces du gène d'interleukine 4 exprimé par les différents effecteurs immunitaires d'asthme allergique afin de garantir la réussite de la PCR et augmentée la spécificité et l'efficacité de l'amplification.

1_ Asthme :

En 2007, National Institute of Health Guidance on Asthma (NIH), a défini l'asthme comme un trouble inflammatoire chronique des voies respiratoires (Mims, 2015), une maladie non transmissible caractérisée par une obstruction intermittente du flux d'air réversible provoquée par une inflammation et une fonction dérégulée des branches respiratoires (Kercsmar et Shipp, 2019).

Apparemment, l'asthme est aussi caractérisé par des crises épisodiques, des oppressions thoraciques, essoufflement et une toux sévère (Haktanir Abul et Phipatanakul, 2019), avec des symptômes facultatives qui peut s'aggraver avec le temps et entrainer une insuffisance respiratoire pendant la période d'exacerbation qui est causées par des infections virales des voies respiratoires supérieures, ou moins fréquemment par l'exposition à des Aero-allergènes et à la pollution d'air (Lambrecht et al, 2019).

L'asthme est associé aussi à plusieurs types de cytokine, qui favorisent l'éosinophilie des voies respiratoires, la surproduction de mucus et la synthèse d'immunoglobulines E (IgE) (Lambrecht et al, 2019), dont il y a l'intervention des effecteurs immunitaires cellulaires tels que les mastocytes, les éosinophiles, les lymphocytes T et B, macrophages, les neutrophiles et les cellules épithéliales (Mims, 2015).

Les données épidémiologiques ont montré qu'au cours des dernières décennies, la prévalence d'asthme a augmenté à la fois aux niveaux national et mondial (Loftus et Wise, 2016), l'asthme est donc devenu un problème de santé sur l'échelle nationale et mondiale.

Environ 334 millions personnes atteints de l'asthme autour du monde (Papi et al, 2018), la prévalence de la maladie se change selon une diversité des impacts.

Le pourcentage augmente par 2.9% chaque année, d'où il y a eu une prédominance masculine dans le diagnostic et avant la puberté, mais un taux plus élevé chez les femmes à l'âge adulte, ainsi que la maladie est plus grave chez les femmes que tel chez les hommes (Loftus et Wise, 2016)

Différentes études lient l'asthme avec les problèmes de qualité de vie, la morbidité, la mortalité des personnes qui souffrent de l'asthme, ou il y a eu 3404 décès en 2010 uniquement dans les Etats Unis (Loftus et Wise, 2016).

Les mécanismes et les caractéristiques pathologiques et immuno pathologiques d'asthme, permet de distinguer plusieurs types sont classés selon les effecteurs immunitaires intervenants.

Tableau 1.1 : mécanismes et caractéristiques pathologiques et immuno pathologiques d'asthme
(Russell et Brighthing, 2017).

	Asthme éosinophilie		Asthme non éosinophilie		Asthme granulocytaire mixte
	Inflammation éosinophilie allergique	Inflammation éosinophilie non allergique	Pauci granulocytaire	Inflammation neutrophilie de type 1 et 17	
Eosinophilie	++	++	-	-	+
Neutrophilie	-	-	-	++	+
Domages épithéliaux	++	++	+	++	++
Mucus	+	+	+/-	++	++
Epaississement de la membrane basale réticulaire	++	++	+/-	+	+
Masse musculaire lisse des voies respiratoire	++	++	+	+	+

2_ Asthme allergique pédiatrique :

2_1_ Généralité :

L'asthme pédiatrique est caractérisé par l'inflammation des branches respiratoires, une hypersensibilités et l'obstruction de flux d'air, la maladie affecte environ 6.8 millions enfants dans les États-Unis uniquement (Bacharier et Guilbert, 2019).

Il a été démontré que la base physiopathologique fondamentale de l'asthme allergique déclenche l'hypersensibilité a une variété des stimulateurs et des allergènes tels que les infections des branches respiratoires supérieures, pollution d'air, tabagisme passif et le pollen (Calatayud-Sáez et al, 2016).

L'asthme allergique est généralement associé à l'eczéma, a la rhinite ou aux allergie alimentaire, a des antécédents familiaux, et a une respiration sifflante ou à une toux accompagnée a une infection, ou il y a eu un tiers des sifflements respiratoires sifflante persistante dès l'enfance jusqu' à l'âge adulte, avec une probabilité d'augmenter et la persistance est associé à la sensibilisation précoce aux allergènes ou au tabagisme (Papie et al, 2018).

Les enfants souffrant de l'asthme sévèrement, peuvent avoir une limitation persistante du débit d'air à l'âge adulte ou un déclin accéléré de la fonction pulmonaire (McGeachie MJ, Yates KP, Zhou X, et al, 2016).

2_2_ Causes :

Il est admis que l'asthme allergique est l'ensemble des interactions génétiques indéniables mais aussi des facteurs environnementaux primordiales qui indique pendant les dernières années une tendance d'augmentation des enfants atteints de l'asthme allergique (MC Delmas, 2016).

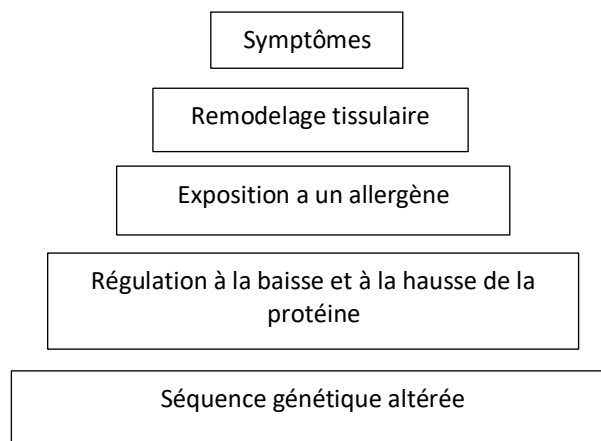


Figure 1.1 : L'asthme est un complexe des interactions gène-environnement entraînant relativement des symptômes.

2_2_1_ Causes environnementales :

La prévalence de la sensibilisation allergique est importante (40-77%) chez les enfants asthmatiques d'où l'exposition fréquente aux allergènes multiples, ou pour un même allergène est un facteur de risque de développement de l'asthme allergique (Owens L, 2018), tel que le pollen de graminées, les acariens ou même le tabagisme passif de l'un des parents ou pendant la grossesse dans certains cas.

2_2_1_1_ L'allergie aux pollens :

Pendant les saisons polliniques, et lors de l'augmentation de la fréquence des orages, un choc osmotique entrainera des grains des pollens libérant des aérosols ultrafins, responsables des épisodes d'exacerbations de l'asthme chez l'enfant (Cecchi L, 2018), en particulier les enfants exposés aux pollens et infectés par le rhinovirus.

2_2_1_2_ Les acariens domestiques :

Les acariens domestiques sont des pneumallergènes, leur inhalation active à la fois la réponse immunitaire innée et adaptative. La sensibilisation par ce type des allergènes peut affecter jusqu'à 50% des enfants atteints de l'asthme avec

une relation dose-dépendante induit au développement de l'asthme allergique et même de la rhinite (Leynaert et al, 2019).

2_2_1_3_ Les animaux domestiques :

Les allergènes venant des animaux domestiques sont des pneumallergènes de l'environnement intérieur importants après les acariens, et restent longtemps dans l'atmosphère, même en absence de l'animal, et la sensibilisation s'observe même avec une exposition faible aux allergènes animaux qui induit à des épisodes d'exacerbations plus ou moins sévères chez l'enfant asthmatiques (Ihouma H, 2017).

2_2_1_4_ Tabagisme :

Des études ont mis en évidence une relation positive entre le tabagisme passif et l'exposition post-nasale à l'allergène de tabagisme de l'un des parents fumeurs à l'enfant asthmatique, l'effet est bien observé si il y a plus que trois fumeurs domicile, ou le nombre des cigarettes fumées est plus que dix par jour qui induira à des exacerbations chez l'enfant et parfois nécessite un passage aux urgences et une hospitalisation (Underner et al, 2015).

2_2_2_ Causes génétiques :

Des études génétiques ont décrit une large hétérogénéité génétique associées à un risque accru d'asthme, lorsque les descendants des parents asthmatiques sont les plus susceptibles à développer ce trouble respiratoire, car des centaines des gènes ont été identifiés (Mims, 2015).

Tableaux 1.2 : différents gènes susceptibles dans l'asthme allergique pédiatrique.

Groupe fonctionnel possible	Gènes
Repliement des protéines dans le réticulum endoplasmique	ORMDL3 GSDMB
Atopie	IL_4, STAT_6, GATA_3
Épithélium	TLR_2, CD14, GSTT
Eosinophiles	IL_33, MYB
Réponse tissulaire	UPAR, TNC
Fonction de barrière	COL29A1, CTNNA3

2_3_ Epidémiologie :

Asthme allergique est une maladie qui affecte généralement les personnes de tous âges, selon le Centre de Contrôle et de Prévention des Maladies CDC et pendant l'année 2016, la prévalence d'asthme chez les enfants d'âge 5 à 11 ans et 12 à 17 ans est 9.6% et respectivement 10.5% dans les états unis (Zahran HS et al

2018), 2.8% en Indonésie, 37.6% en Costa Rica chez les enfants de l'âge 6 a 7 ans, 3.4 en Albanie, a 31.2 dans les Iles de Man pour les enfants d'âge 13 a 14 ans et de 4.1% en Algérie parmi eux il y a eu 20% enfants scolarisées (Papie et al,2018).

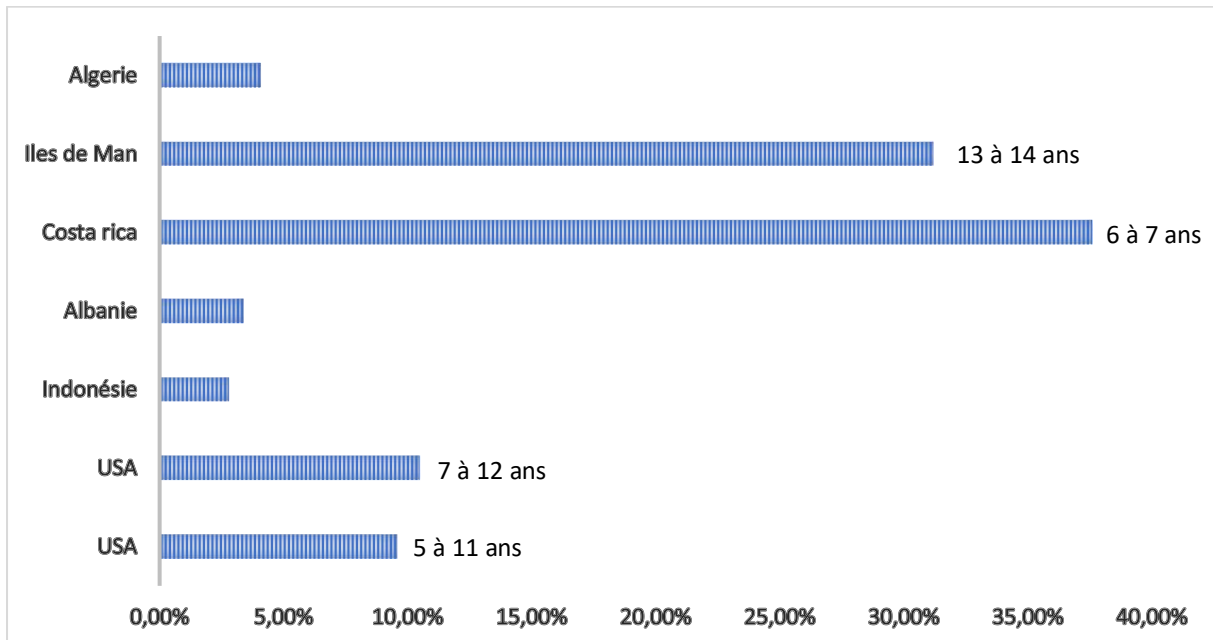


Figure 1.2 : pourcentage des enfants asthmatiques en % par âge dans le monde (d'après le CDC en 2016), (Zahran HS et al 2018), (Papie et al,2018).

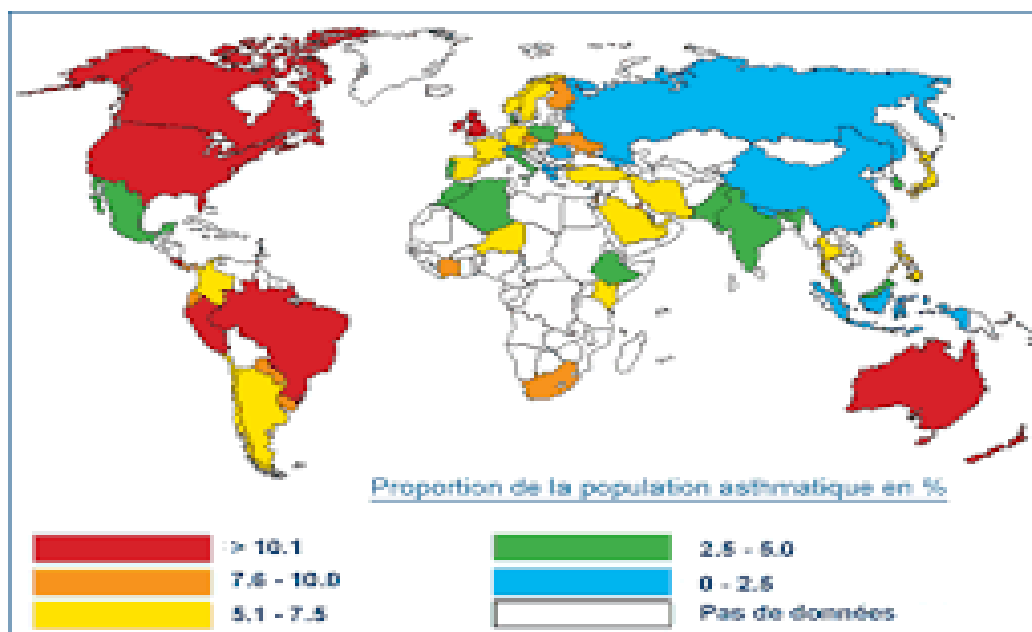


Figure 1.3 : distribution des sujet atteints de l'asthme dans le monde selon le CDC.

2_4_ Diagnostique :

Pour effectuer le diagnostic les symptômes de l'asthme de sujet doit répondre à un questionnaire avec lequel le médecin peut déterminer la présence de la maladie, tels que la respiration sifflante, l'essoufflement et l'oppression thoracique, les personnes asthmatiques présentent la majorité de ces symptômes qui surviennent de façon variable dans le temps et l'intensité et s'aggravent pendant la nuit ou au réveil, et sont souvent déclenchés par l'exercice, le rire, les allergènes et l'air froid (GINA,2020).

Puis le médecin passe à un exercice attentif de l'activité quotidienne de l'enfant ou le test de provocation bronchique, lorsque l'activité physique est un déclencheur important des épisodes de l'asthme. Ce défi de l'exercice est le plus couramment utilisée à condition que la fréquence cardiaque est supérieure à 180/bpm pendant les trois dernières minutes d'un test de 8 minutes, pour cela la plupart des enfants présentant d'asthme induits par cet exercice auront un test positif.

Cependant un test négatif n'exclut pas d'asthme

Cela demande de confirmer l'absence d'asthme asymptomatique chez l'enfant par l'étude de la limitation variable de débit d'aire expiratoire définie comme une variation qui est en dehors de la plage normale pour les individus en bonne santé.

Elle est associée à un rapport de volume expiratoire forcé en 1 second (FEV1) a la capacité vitale forcé (FVC) de moins que prévus en fonction de l'âge, de sexe, de la taille et de race, étudiée par le réversibilité dite bronchodilatatrice, une augmentation de VEMS de plus de 12% et supérieure à 200 ml (enfant > 12%), 10 à 15 minutes après l'administration d'un agoniste β_2 à action rapide indique une variation en dehors de la plage normale ce qui indique la présence de la maladie (Papi et al, 2018).

2_5_ Crises d'asthme :

Des épisodes aigus ou subaigus de symptômes accrus qui nécessite le changement de traitement et parfois l'hospitalisation, appelés aussi l'exacerbation, crises d'asthme ou poussées rythment la cour naturelle d'asthme.

Ces exacerbations sont caractérisées par une augmentation progressive de l'essoufflement, une toux, une respiration sifflante et une oppression thoracique à la fois une diminution de la fonction pulmonaire et le début est généralement rapide chez les enfants asthmatiques, distinguant quatre types d'exacerbations légère, modéré, sévère et aigue grave (Duncan EM, Fahy JV, 2015).

2_6_ Processus immunologique :

Pendant l'asthme allergique éosinophilique, après une sensibilisation allergique et une stimulation conséquente par les cellules dendritiques les cellules T helper 2 (Th2) adaptatives produisent de l'interleukines 4, 5 et 13. L'interleukine 5 est une cytokine essentielle pour la survie et la maturation des éosinophiles.

Leur recrutement dans la muqueuse pulmonaire se fait par l'intermédiaire des chimiokines de récepteur 3 des chimiokines a motif C_C et d'autres chimio attractantes des éosinophiles tels que la prostaglandine D2 dérivés des mastocytes.

L'interleukine 4 stimule la commutation des isotypes des cellules LB et la synthèse des IgE qui se lient aux récepteurs IgE de haute affinité des mastocytes, entraînant leur activation et puis le développement d'une inflammation d'épithélium des branches respiratoire puis la surproduction de la muqueuse bronchique qui induit les symptômes d'asthme (Papi et al, 2018).

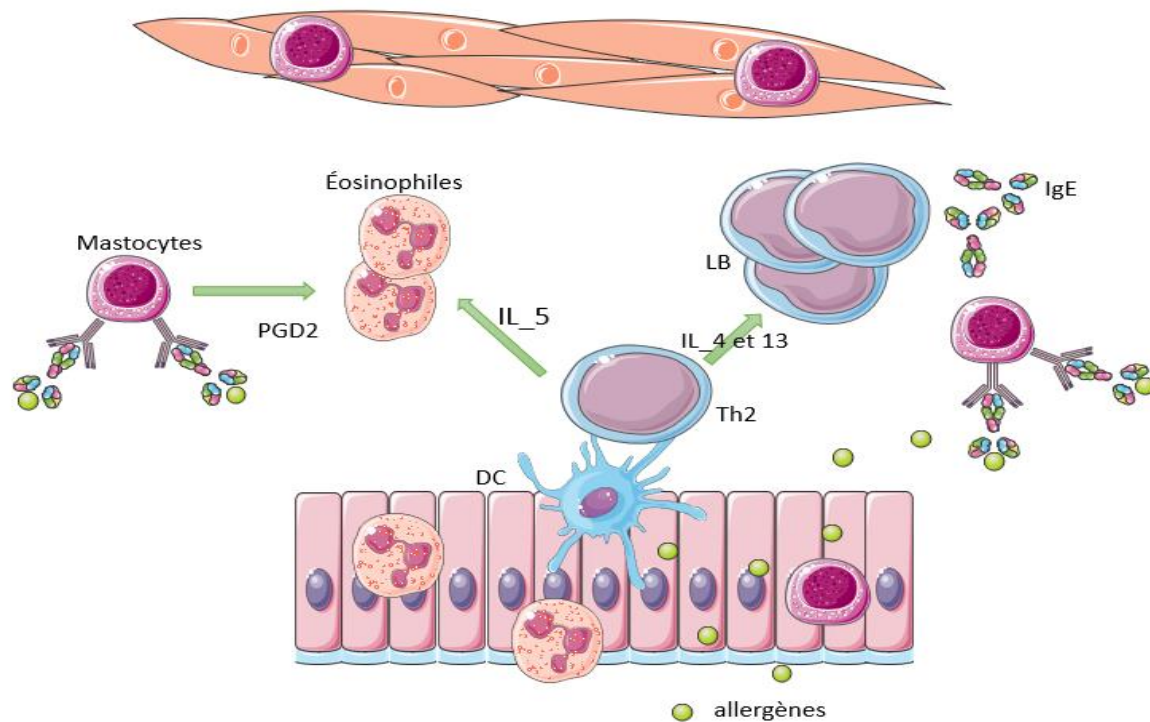


Figure 1.4 : Mécanisme immuno-pathologique de l'asthme allergique éosinophilique.
(DC : cellule dendritiques, LB : lymphocytes B, IgE : immunoglobulines E, Th2 : lymphocytes T helper, IL_4, 5,13 : interleukines 4, 5,13, PGD2 : prostaglandine D2).

2_7_ Traitement et contrôle de l'asthme :

La figure ce dessous représente la stratégie de traitement de l'asthme pour les enfants d'âge de 6 à 11 ans selon le programme GINA 2020.

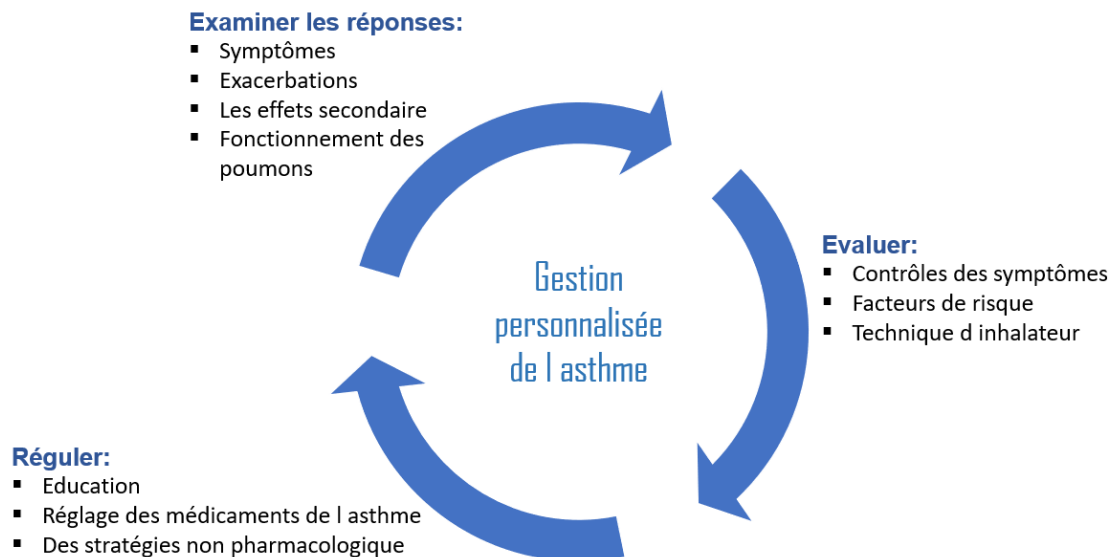


Figure 1.5 : stratégie de traitement et contrôle de l'asthme selon la GINA 2020.

Les traitements sont ajustés de haute en bas selon les besoins individuels de l'enfant asthmatique.

La détermination de niveau de contrôle de la maladie permet au praticien d'adapter le schéma thérapeutique afin d'obtenir une prise en charge optimale et de diminuer le nombre d'exacerbation (Al dandachi, 2013), selon le tableau dessous :

Tableau 1.3 : les critères de planification de traitement et de contrôle d'asthme (Al dandachi, 2013).

Critères	Contrôles	Partiellement contrôler	Non contrôler
Symptômes diurns	≤ 2 fois par semaines	> 2 fois par semaines	3 ou plus de critères d'asthme partiellement contrôler présente dans n'importe quelle semaine
Symptômes ou réveils nocturnes	Aucune	Présente	
Recours au traitement variabilité	≤ 2 fois par semaines	> 2 fois par semaines	
Limitation des activité	Aucune	Présente	
Fonction pulmonaire (VEMS/DEP)	Normale	< 80% de valeur prédite ou de la meilleur valeur personnelle	

Deux types des médicaments sont utilisés par les sujets asthmatiques avec des doses différents ajustés en fonction de la gravité de l'asthme, le tableau dissous montre la dose le type de médicaments à chaque palier de la maladie.

Tableau 1.4 : la stratégie de traitement et de contrôle d'asthme selon ces différents stades selon GINA 2020.

Palier de la maladie	Contrôleur préféré pour contrôler les symptômes et éviter les crises	Autres options contrôleurs	Autres possibilités
<ul style="list-style-type: none"> Palier 1 Symptômes moins de fois par semaines 		ICS a faible dose prise chaque prise de SABA inhalés	SABA selon le besoin
<ul style="list-style-type: none"> Palier 2 Symptômes 2 fois par semaines mais moins que quotidiennement 	Corticoïdes inhalés à faible dose par jour (ICS)	LTRA ou ICS à faible dose prise à chaque prise de SABA inhalés	
<ul style="list-style-type: none"> Palier 3 Les symptômes la plupart des jours, l'asthme se manifeste une fois par semaine ou plus 	Faible dose d ICS_LABA ou dose moyenne d ICS	Faible dose d ICS_LTRA	
<ul style="list-style-type: none"> Palier 4 L'asthme se manifeste une fois par semaine ou plus + fonction pulmonaire faible 	Une dose moyenne d ICS_LABA	Forte dose d ICS_LABA ou ajouté soit le Tiotropuim ou LTRA	
	Faible dose d OCS peut être ajoutée pour les sujets avec asthme sévère		
<ul style="list-style-type: none"> Palier 5 	Référent pour évaluation phénotypique, l'ajoute d'un traitement tels que IgE	L ajoute d'un anti-IgE, faible dose d OCS prend en considération les effets secondaires	

Les deux types des médicaments utilisés par les sujets asthmatiques sont les contrôleurs et les médicaments de soulagements.

- ✓ Les médicaments préventifs et dites aussi les contrôleurs protègent les poumons et empêchent le déclenchements des crises d'asthme, les contrôleurs contient une faible dose des corticostéroïdes administrés sous forme inhalée en aérosol doseur ou en inhalateur réduisent l'inflammation des branches contribuant aussi à améliorer le passage de l'air avec l'absorption d'une très petite quantité par les poumons, peut être combinées dans un même inhalateur avec les médicaments de type analgésique a action rapide prolongés (GINA, 2019).

Tableau 1.5 : les doses des corticoïdes prescrit par le praticien pour les enfants asthmatiques âgés de 6 à 11 ans (GINA, 2020).

ICS : corticoïdes inhalées	Dose d ICS (msg)		
	Faible	Moyenne	Forte
-BDP (HFA)	100-200	>200-400	>400
-Budésonide (DPI)	100-200	>200-400	>400
-Budésonide (nebulas)	250-500	>500-1000	>1000
-Ciclesonide (HFA)	80	>80-160	>160
-Fluticasone furate (DPI)	50	>50	n.a
-Fluticasone propionate (DPI)	50-100	>100-200	>200
-Fluticasone propionate (HFA)	50-100	>100-200	>200
-Mometasone furate (HFA)	100	>100	>200

- ✓ Les médicaments de soulagement rapide et dites aussi les analgésiques sont utilisés pour soulager les symptômes de l'asthme, les médicaments analgésiques possèdent un effet bronchodilatateur par la fixation sur le récepteur de β_2 agonistes qui induit à une bronchodilatation continue et plus puissant et la diminution des exacerbations (GINA, 2020).

3_ Asthme et microbiote intestinale :

3_1_ Généralité :

Le microbiote intestinal joue un rôle important dans le développement de système immunitaire et la régulation des réponses d immunités (Zimmermann et al., 2019), dont les communiantes microbiennes intestinales façonnent la maturation immunitaire.

Le microbiote a été impliqué dans les modèles expérimentaux et les études cliniques sur la prédisposition à l'asthme, malgré leurs séparations anatomiques sont maintenant appréciées de jouer un rôle important dans la sensibilisation allergique ainsi que les troubles respiratoires (Ver Heul et al., 2019).

3_2_ Hache intestin_poumons :

Dysbiose dans le microbiote intestinal approuvé est associée à un trouble pulmonaire et des infections respiratoires, dont la réduction de genre Bifidobactérium et de Clostridia dans l'intestin sont associées à l'asthme au début de la vie.

Les études murines montrent que l'épuisement de certaines espèces dans le microbiote intestinales en raison de la prise des antibiotiques influence sur les maladies pulmonaires et l'inflammation allergique, le changement dans la communauté microbienne pulmonaire influence également la composition de microbiote pour cela l'intestin et les poumons sont intrinsèquement des organes liés qui s'influencent mutuellement (Anand and Mande, 2018).

3_3_ Microbiote et cellules immunitaire :

3_3_1_ T reg :

Jouent un rôle essentiel dans l'allergie, chez les souris le blocage de la périphérie de T reg entraîne une inflammation de types Th2 au niveau des sites dans les systèmes modèles, leur fonction est régulée par les acides gras à chaîne courte, AGCC principalement l'acétate, propionate ou le butyrate, produits par la fermentation par les bactéries anaérobies des fibres alimentaires, dont le régime alimentaire est riche en AGCC cela induit l'inflammation pulmonaire allergique, lorsque les AGCC peuvent également protéger contre l'asthme par des biais mécanismes.

En revanche un régime pauvre aux fibres alimentaires, les sujets sont moins exposés aux AGCC et l'inflammation s'accumule dans les voies respiratoires, le microbiote intestinal et leurs métabolites modulent la différenciation des T reg (Ver Heul et al, 2019).

3_3_2_ Th17 :

L'axe Th17 est important pour maintenir la fonction de barrière et l'élimination de pathogène sur la surface de muqueuse tandis que sa dérégulation a été impliquée dans toute une série de troubles inflammatoires.

Le microbiote intestinal joue un rôle clé dans le développement et le conditionnement de l'axe TH17, chez les souris une seule espèce bactérienne filamenteuse segmentée peut induire le développement des Th17 dans l'intestin,

Les réponses inflammatoires Th17 sont un exemple de l'axe intestin-poumon où les réponses immunitaires provenant de l'intestin conduisent à une

pathologie pulmonaire, tandis que les infections respiratoires induisant une réponse Th17 peuvent entraîner des lésions intestinales. Cela illustre le potentiel des perturbations du microbiote intestinal d'influencer l'inflammation à des sites distants, tels que les poumons et mettent en évidence leur potentiel à influencer l'asthme (Ver Heul et al, 2019).

3_3_3_ iNKT :

Les iNKT remplissent une niche importante dans la fonction immunitaire innée et adaptative grâce à leur capacité massive de libérer des cytokines selon le contexte peut être prédominant des cellules TH1 ou Th2.

Les études animales illustrent le potentiel de microbiote intestinale pour diriger le développement et le fonctionnement des populations des iNKT dans les poumons, dont les souris dépourvus de microbiote intestinales (sans germes), les cellules iNKT s'accumulent dans l'intestin et les poumons et induit l'augmentation de la sensibilisation et a l'inflammation dans ces sites par rapport aux souris hébergent un microbiote intestinales normale (Ver Heul et al, 2019).

3_3_4_ les cellules dendritiques :

Les cellules dendritiques avec leur grande capacité phagocytaire mais aussi une capacité réduite à promouvoir l'inflammation Th2 allergique des voies respiratoires ou le régime riche en fibre alimentaire augmente l'infiltration de ces cellules dans les poumons (Ver Heul et al, 2019).

3_4_ Résultats de l'examen systématique :

Une recherche systématique de MEDLINE a été effectuée en avril 2018, abouti à un totale de 47 études, les résultats sont rapportés de 11954 échantillons de selles de 3071 enfants allergiques prélevées à différents moments entre les premiers jours de la vie jusqu'à 20 ans.

Des tests cutanés ont été mesurés dans 20 études, et des Ig ont été mesurés dans 23 études.

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour déterminer la bactérie de microbiote intestinal y a compris la culture cellulaire (1 étude), le RTPCR (15 études), séquençage de génome entière (7 études), séquençage de gene de 16S (15 études), PCR multiplex (2 études), hybridation fluorescente in situ (5 études) ainsi d'autres méthodes (Zimmermann et al, 2019).

Les 7 études résumées dessous montrent l'association entre le microbiote intestinal et la sensibilisation allergique et l'asthme chez les enfants.

Tableau 1.6 : résultats des études d'association des bactéries de microbiote intestinale et la sensibilisation allergique et l'asthme chez les enfants.

Auteur Pays d'étude Date de publication	Nombre d'échantillons totaux	Techniques d'analyses d'échantillons	Age aux selles collections	Age aux résultats mesure	Résultats mesurés	Principaux résultats
Arrieta et al Equateur 2017	27 70 96	RTPCR, séquençage du gene d' ARNr 16S, base de données	3 mois	5 ans 5 ans	Questionnaire sur les symptômes de la respiration siffiante SPT (allergène inhalée ou alimentaire)	Enfants avec une respiration siffiante atopique <ul style="list-style-type: none"> • Aucune différences dans la diversité bactérienne et fongique à 3 mois • Une plus grande abondance relative des genre Streptococcus et Ruminococcus à 3 mois • L'abondance relative plus faible des genre Bacterioids et Bifidubactérium
Stiemsma et al Canada 2016	39 37 113	Séquençage du gene d' ARNr 16S, RTPCR	3 et 12 mois	60 mois 12 et 36 mois 12 et 36 mois	Questionnaire sur les symptômes d'allergie et d'asthme Examen clinique de l'acné, la rhinite et l'asthme SPT (allergène inhalée ou alimentaire)	Enfant asthmatique <ul style="list-style-type: none"> • Aucune différences dans la diversité bactérienne et fongique à 3 et 12 mois • Abondance relative plus faible de genre Lachnospira à 3 mois • Une plus grande abondance relative de l'espèce C. néonatale à 12 mois
Fujimura et al Etats unis 2016	72 226 596	Séquençage du gene d' ARNr 16S	1 et 6 mois	1,6,12,24, 48 mois 24 mois 24 mois	Questionnaire sur les symptômes d'allergie et d'asthme Examen clinique des symptômes d'allergie et l'asthme IgE (allergène inhalée ou alimentaire)	Enfant atteints d atopie d'asthme <ul style="list-style-type: none"> • Une plus faible abondance relative des genres Bifidubactérium, Akkermansia et Foecalibactérium à 1 et 6 mois • Une plus grande abondance relative des genres Candida et Rhodotorula à 1 et 6 mois • Aucune association entre la diversité de microbiote intestinale et l atopie ou l'asthme risqué

Arrieta et al Canada 2015	245 74 698	RTPCR, Séquençage du gene d ARNr 16S	3 et 12 mois	30,36,48 et 60 mois 12,36 et 60 mois 12,36 et 60 mois	Questionnaire sur les symptômes d'allergie, d'asthme et d'eczéma Examen clinique des symptômes d'allergie, l'asthme Et d'eczéma SPT (allergène inhalée ou alimentaire)	Nourrissons souffrant de la sensibilisation allergique et la respiration sifflante <ul style="list-style-type: none"> • Aucune différences dans la diversité bactérienne à 3 et 12 mois • L'abondance relative la plus faible des genres Lachnospira, Veillonella, Foecalibacterium et Rothia à 3 mois • L'abondance relative la plus faible des genres Lachnospira et Veillonella à 12 mois
Van Nimwegene et al Hollande 2011	942 10 452	Culture cellulaire, RTPCR	1 mois	24 mois 12,24 et 72-84 mois	Examen clinique d eczéma IgE (allergène inhalée ou alimentaire)	Enfant avec respiration sifflante à 72-84 mois <ul style="list-style-type: none"> • Colonisées fréquemment par l'espèce C difficile à 1 mois Enfant asthmatique à 72-84 mois <ul style="list-style-type: none"> • Colonisées fréquemment par l'espèce C difficile à 1 mois
Vael et al Belgique 2011	24 86 110	DGGE	21 jours	21 jours 6,12,18, 24,30,36 mois	Questionnaire sur les symptômes d'allergie, d eczéma (asthme indice prédictif)	Les nourrissons ont risqué accru d'asthme respiration sifflante et aczéma et antécédents familiaux positive pour l'asthme <ul style="list-style-type: none"> • Colonisés fréquemment par ceux-ci β fragilis
Vael et al Belgique 2008	26 91 117	Culture cellulaire	21 jours	21 jours 12,18,24, 30,36 mois	Questionnaire sur les symptômes d'allergie, d eczéma (asthme indice prédictif)	Enfant a risque accumule d'asthme Respiration sifflante et aczéma et antécédents familiaux positive pour l'asthme <ul style="list-style-type: none"> • Plus grande abondance relative des bactéries anaérobies à 21 jours • Plus grande abondance relative de l'espèce β fragilis à 21 jours

Ces études ont rapportés que les nouveaux nés et les enfants d'âge minime ont une respiration sifflante et de l'asthme ont une plus grande abondance relative d'anaérobies β fragilis, *C.difficile*, *Bifidubactérium*, une faible abondance relative des genres streptococcus, *Lachnospira* et de *Foecalibactérium* (Zimmermann et al, 2019).

4_ Interleukine 4 :

4_1_ Généralité :

La première découverte d'IL_4 a été pendant les années 1982-1989 qui a été appelée d'abord BCGF1, puis BSF1 et finalement l'interleukine 4 (Gour N, Wills-Karp M, 2015), est une glycoprotéine faisant partie de la famille des interleukines, avec une structure comprenant 4 hélices α (J.Banchereau, 1990), sécrétée par une variété des cellules tels que les lymphocytes T cd4+, les mastocytes, les éosinophiles, les basophiles, les NKT, les ILC2 et les cellules Tfh folliculaire accessoire d'une manière particulière (Liang HE et al, 2011).

L'interleukine 4 est l'une des cytokines qui régulent l'aspect allergique et l'inflammation, participe à la régulation aussi des fonctions de plusieurs types cellulaires, la réponse des lymphocytes, elle est considérée comme un régulateur clé de la différenciation des LT cd4+, l'activation des macrophages alternative et la stimulation de la commutation isotypique des LB des Ig pour induire la production des IgE et des IgG1 (Juntilla, 2018).L'effet biologique d'IL_4 dépendant d'activation des cellules cibles, environnement cellulaire et d'autres cytokines, donc elle agit sur le métabolisme, la résorption osseuse, le comportement cognitif et la régénération tissulaire (Karo-Atar et al, 2018).

Tableau 1.7 : propriétés d'interleukine 4 (J.Banchereau, 1990).

Interleukine 4		
	Homme	Murin
Protéine précurseur (A.A)	153	140
Protéine sécrétée (A.A)	129	120
Sites de N_glycosylation	2	3
Taille de gène (Kda)	10	6.7
Localisation chromosomique	5q23.31	11
Source cellulaire	Plusieurs cellules	LT, mastocytes
Récepteur (Kd)	$\approx 10^{-10}$ M	$\approx 10^{-10}$ M

4_2_ Récepteur :

L IL_4 possède deux types de récepteurs dimériques distincts, l IL_4R de type I comprend la chaîne IL_4R α couplée à la chaîne γ c commune, et l IL_4R de type II comprend aussi la chaîne IL_4R α couplée à la chaîne IL_13R α 1.

L'expression de l IL_4R de type I est limitée (150-5000 molécules/cellules) par les cellules immunitaires de lignée lymphoïde et myéloïde, alors que le récepteur d IL_4R de type II est largement exprimé (5000-150.000 molécules/cellules) (Park L.S et al, 1987)(Obiri NI et al, 1995) sur les surfaces des cellules non hématopoïétiques tels que les cellules épithéliales, les fibroblastes et sois exprimés même sur les surfaces des cellules myéloïdes, et presque complètement absent sur les lymphocytes T et B (Juntilla, 2018).

L IL_4 se lie à la chaîne IL_4R α de type I et II et non sur la chaîne secondaire associée, ou il y a eu un motif ITIM intrinsèque dans la partie intracellulaire de cette chaîne (Claude Rathé, 2008), et l'expression de la chaîne secondaire associée varie selon le type cellulaire.

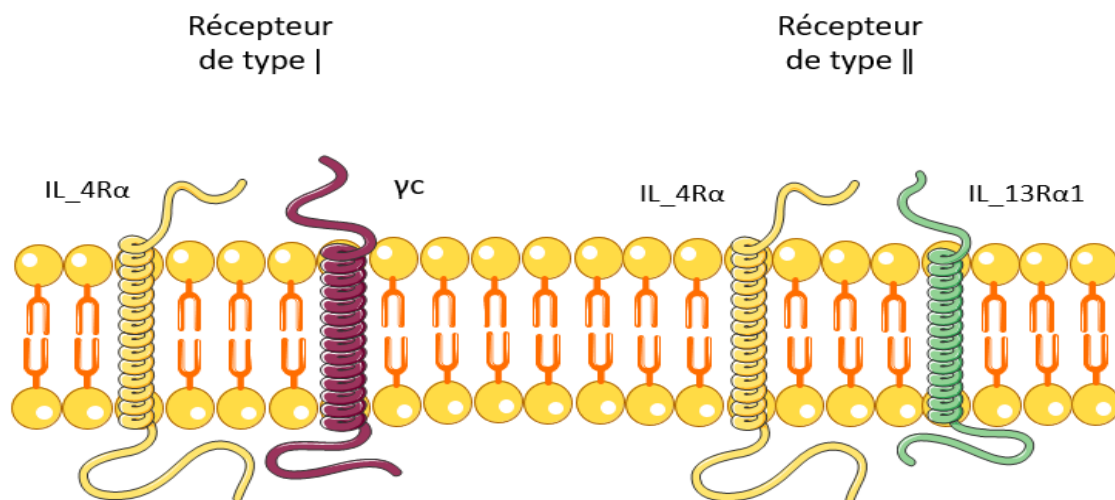


Figure 1.6 : les deux types de récepteurs d'interleukine 4.

4_3_ Gène :

Pendant les années passées, le locus du gène d IL_4 a été déterminé sur le chromosome 11 murin, et sur le bras long de chromosome 5q23.31 chez l'homme, situé entre les gènes de RAD50 et KIF3 α (Paul, 2015).

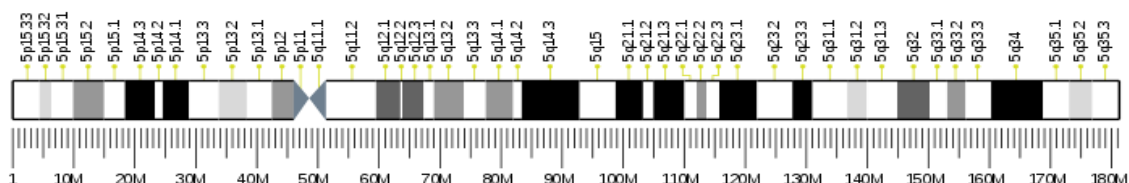


Figure 1.7 : le locus d'interleukine 4 sur le chromosome 5 humain.

4_4_ signalisation :

Dans l'asthme I IL_4 se lie au récepteur d IL_4, particulièrement la sous unités IL_4R α de deux types de récepteurs, après l'association de ligand avec la chaîne IL_4R α , cette dernière se couple avec la chaîne γ commune (γ c) pour former un signal de récepteur de type I (Gandhi NA et al, 2017), et se couple avec la chaîne IL_13R α 1 pour former le récepteur de type II, ce qui induit à l'activation des tyrosines kinases de la famille Janus (JAK), qui stimulent le recrutement et la phosphorylation de la tyrosines de state 6 (Kelly Welch et al, 2003), ce dernier se dimérise et se déplace vers le noyau, ou il y a eu la régulation de la transcription de gène sensible d IL_4 impliqués dans la différenciation des Th2, la commutation de classe isotypique des lymphocytes B, la synthèse des IgE, la surproduction de mucus et l'hyperréactivité des voies respiratoires (Parulekar et al, 2018).

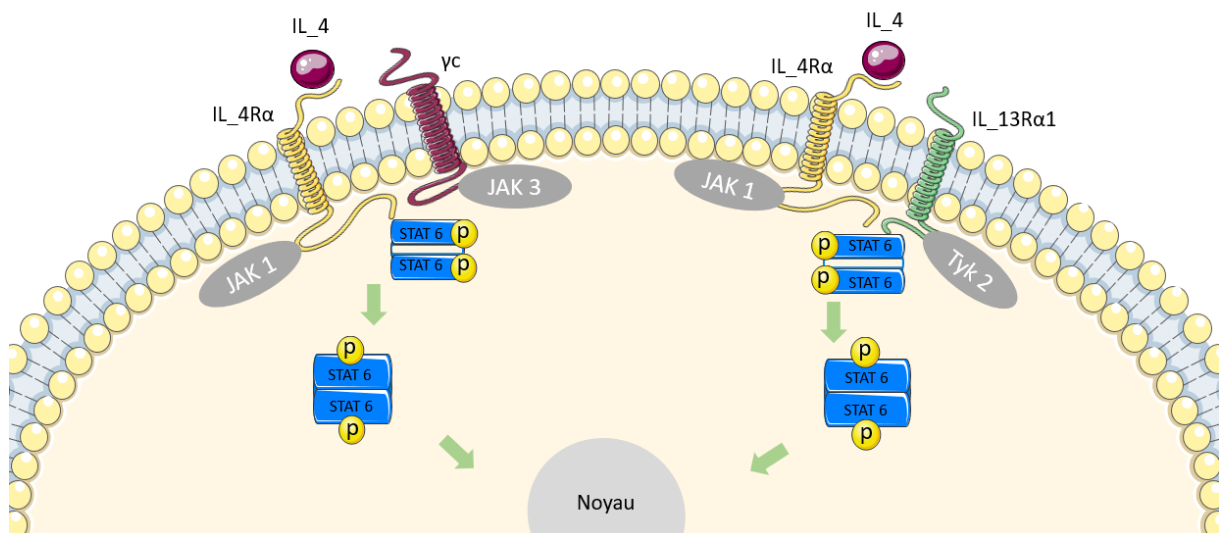


Figure 1.8 : voie de signalisation induit par l'interleukine 4 et ses récepteurs.

4_5_ Profile anti inflammatoire (IL_4) au cours d'asthme allergique :

Au cours de l'asthme allergique, et lors d'une sensibilisation par un allergène, les cellules dendritiques d'épithélium des branches respiratoire stimulent la différenciation des lymphocytes Tcd4+ vers un profile anti-inflammatoire LTh2, ces cellules elle-même secrètent des cytokines anti-inflammatoires tels que I IL_4, recrutant autre effecteur immunitaire, les lymphocytes B et la stimulation de la commutation isotypique et la synthèse des IgE, ainsi les mastocytes sur lesquelles les IgE fixent sur des récepteurs de haute affinité induisant la libération des facteurs attractantes (PGD2) qui recrutent les éosinophiles, et provoque une éosinophilie des branches respiratoires qui persiste l'inflammation et favorise la maladie.

5_ PCR (Polymérase Chaîne Réaction) :

5_1_ Définition :

La méthode de la réaction en chaîne par polymérase a été une innovation révolutionnaire de Kary.Moullis pendant les années 1980 (Mullis KB, Faloona FA, 1987) (Mullis KB, 1990), est une méthode d'analyse enzymatique, il a vu l'utilisation répondue dans la recherche biomédicale, car il peut détecter et quantifier des petites quantités de spécifiques séquences d'acides nucléiques.

Permet l'amplification exponentielle de fragment d'ADN spécifique in vitro à l'aide d'un thermocycleur (Hawkins et Guest, 2017).

5_2_ Principe :

La technique de PCR se base sur les principes suivants :

- ✓ Connaître les séquences d'intérêts pour synthétiser des amorces spécifiques.
- ✓ Synthèse des séquences complémentaires d'ADN ou d'ARN par des amorces spécifiques constituent d oligonucléotides de synthèse des 20 à 25 nucléotides.
- ✓ Synthèse enzymatique et l'initiation spécifique à l'ADN double brins à l'ADN polymérase.
- ✓ La répétition de cycle de transition de la température contrôler par un thermocycleur.

5_3_ Les étapes de PCR :

Etape 1 : dénaturation, l'ADN est en hélice double brins, donc il sera séparé à 95 c° pendant 5 minutes.

Etape 2 : hybridation des amorces a 50 – 60 c° pendant une minute.

Etape 3 : élongation de nouveau brin complémentaire synthétiser à l'aide de Taq polymérase a 72 c° pendant une minute.

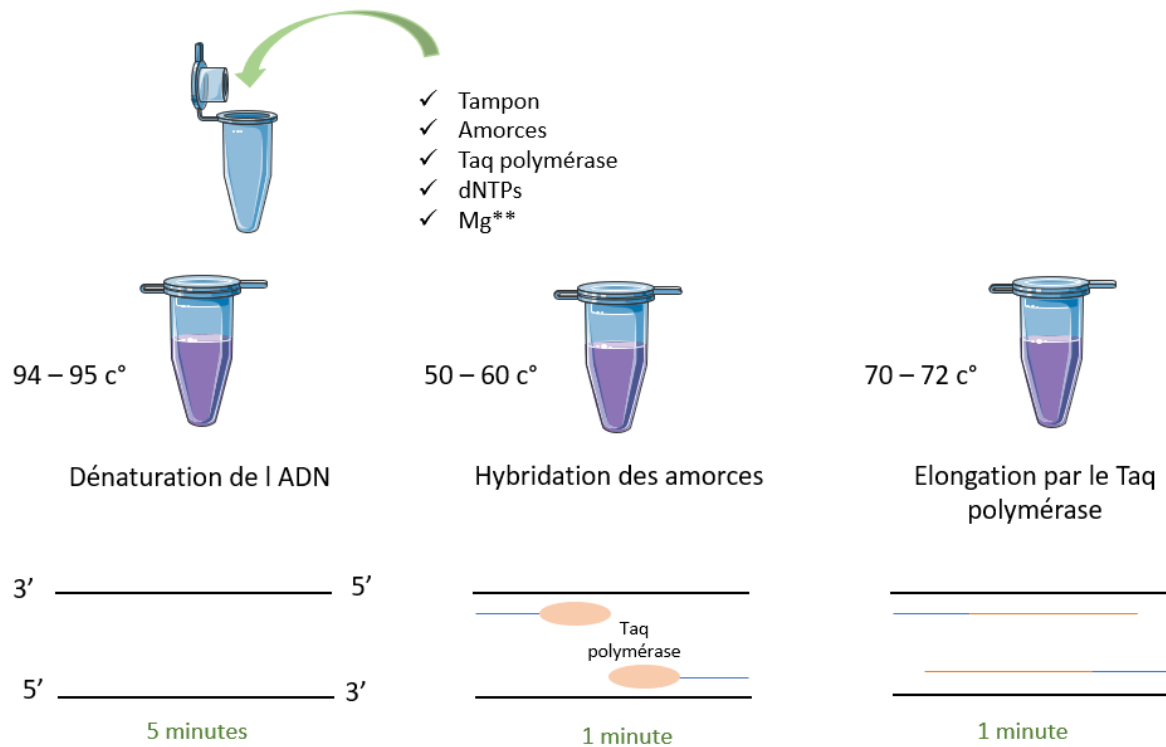


Figure 1.9 : Les étapes de PCR.

5_4_ Les acteurs de PCR :

5_4_1_ L'ADN : une hélice double brins, sur lesquelles se trouvent les fragments à amplifier.

5_4_2_ Les amorces, sens et anti sens : dites aussi les Oligonucléotides de synthèse d'environ 20 à 25 nucléotides, capables de s'hybrider d'une manier spécifique aux ADN à amplifier pour synthétiser un brin complémentaire ADNc.

5_4_3_ Taq polymérase : une enzyme thermorésistante extraite à partir des bactéries *Thermus aquaticus*, résistent aux transitions de la température et induit à l'automatisation de PCR.

5_4_4_ Les nucléotides : dNTPs (désoxy Nucléotides Triphosphates) ; dGTP, dCTP, dATP, dTTP, utilisées pour synthétiser le brin complémentaire d'ADN à amplifier.

5_5_ Choix des amorces :

5_5_1_ Spécificité :

Le bon choix d'amorces (oligonucléotides) nous permet d'amplifier notre ADN d'intérêt et pas n'importe quel autre ADN, même si l'ADN était contaminé par un ADN étranger en aimerait que l'amplification de ce dernier ne soit pas possible.

5_5_2_ Les outilles :

- La connaissance de la séquence étudiés et les autres séquences qui partagent des similitudes (Ensembl.org, NCBI et PubMed).

- Le choix de primer à partir de plusieurs exons séparer par des introns (Ensembl.org, BLAST).
- L'étude des primer.

5_5_3_ les caractéristiques d'une bonne pair d amorces :

- La spécificité, il faut que l'amorce soit spécifique de la région qu'en veut l'amplifier et de ne pas amplifier d'autre région de génome puis qu'elle donne des produits aspécifiques.
- La longueur d amorces ne dépasse pas 20 à 25 nucléotides.
- Le pourcentage de CG ne dépasse pas 40% et particulièrement dans la région 3'.
- La température melting d'hybridation, la différence entre le Tm et les amorces ne dépasse pas 4 c°.
- Pas de complémentarité entre les amorces sens et anti-sens.
- Pas d'auto-complémentarité dans chacune des amorces.

Problématique :

L'interleukine 4 est une cytokine de type 1 anti inflammatoire impliquée dans l'inflammation des branches respiratoire chez les sujets jeunes souffrants d'asthme allergique, la cytokine a un effet sur la progression de la maladie, pour cela l'étude du gène de cette cytokine par les méthodes de la biologie moléculaire tels que la PCR peut aider les chercheurs a ciblés la molécule comme une nouvelle méthode de contrôler et traiter l'asthme, cela fait l'objectif de notre étude qui consiste à concevoir les bonnes pairs d'amorce afin d'assurer la réussite de la reaction de polymerase en chaine a l'aide des outils de la bio-informatique.

Objectif :

Concevoir le bon pair d'amorce à l'aide des logiciels de la bio-informatique tels que le Primer Blast.

But :

Choisir le bon couple d amorces conçus par le Primer Blast qui assurent une bonne amplification de la PCR qui fait l'intérêt de nombreux futures études associés à le gène d IL_4, une cytokine participe dans la progression d'une variété maladies respiratoire.

1_ conception des amorces :

Un paramètre très important pour le PCR, qui vise à trouver un équilibre entre deux objectifs essentiels : la spécificité et l'efficacité de l'amplification, pour lesquelles la sélection des amorces dites aussi les oligonucléotides est souvent critique (Dieffenbach et al., 1993).

Le choix des amorces appropriés est probablement le facteur le plus important qui affecte la réaction en chaîne par la polymérase, lorsque l'utilisation d'une amorce mal conçue empêche le fonctionnement de la réaction et induit à une faible production de l'ADN à cause d'une amplification non spécifique (Oni et al, 2018). Comme le résultat de PCR puisse être influencé par d'autres facteurs et conditions tels que la préparation de l'ADN matrice et les conditions de la réaction (Touati, 2012).

2_ sélection des amorces :

On doit prendre en compte plusieurs facteurs lors de la sélection des amorces pour l'amplification, ces derniers contrôlent l'équilibre entre deux paramètres essentiels : la spécificité et l'efficacité de la réaction, parmi ces facteurs il y a eu la longueur d'amorce, la température de fusion, la teneur en GC et bien d'autres qui ont des effets préversibles sur les paramètres de l'amplification.

L'efficacité : est défini comme à quel point un pair d'amorces est capable d'amplifier un produit à l'optimum réticulaire d'une double augmentation du produit pour chaque cycle de PCR (Dieffenbach et al, 1993).

2_1_ La spécificité :

La spécificité est la fréquence des événements d'amorçage appropriés (Álvarez-Fernández, 2013), elle est contrôlée par la longueur d'amorce et la température de recuit de la réaction de PCR.

Notamment, les amorces les plus courtes induisent à une spécificité plus faible, en parlant des oligonucléotides avec des longueurs inférieures à 18 nucléotides, et sont plus susceptibles de provoquer un mauvais fonctionnement avec les modèles complexes, tels que l'ADN génomique, alors que les amorces les plus longues induisent à une spécificité plus élevée (Álvarez-Fernandez, 2013).

Donc afin d'optimiser le PCR l'utilisation des amorces d'une longueur entre 18 et 24 nucléotides qui assurent des températures de fusion environ 54 °C augmentera la chance de maintenir l'équilibre entre la spécificité et l'efficacité (Dieffenbach et al, 1993).

2_2_ La longueur d'amorce « oligonucléotide » :

Un facteur essentiel pour assurer la réussite de la PCR, la sélection d'une amorce avec une longueur optimal a la réaction induit à une meilleure amplification.

Les amorces d'une taille entre 18 et 24 bases ont une tendance à être très spécifique à la séquence pour une température d'hybridation optimale, alors que les oligonucléotides courtes de 15 bases ou moins sont utiles que pour une quantité de protocoles de PCR tels que l'utilisation d'amorces courtes arbitraires ou aléatoires dans la cartographie de génomes simples et dans le protocole de bibliothèque de soustraction décrit par Williams et Liang et Pardee (Dieffenbach et al, 1993), donc plus l'amorce a une certaine longueur ou plus longue plus l'hybridation est efficace.

2_3_ La température de fusion :

La température de fusion symbolisez le T_m est la température à laquelle la moitié des brins d'amorces sont liées à la cible avoir (Dieffenbach et al, 1993).

S'installera entre 56-62 c°.

2_4_ La teneur en GC :

Les amorces de PCR doivent contenir un certain pourcentage de GC environ 40-60 % (Dieffenbach et al., 1993), lorsque les fragments d'ADN avec un différence contenue de GC n'assurent pas une bonne amplification (Ishihara et al, 2017). L'amorce sélectionnée pour la réaction de PCR doit présenter un mélange aléatoire des nucléotides, en évitant également les mononucléotides qui dure plus de quatre fois comme exemple CCCC, ainsi il faut éviter la répétition de dinucléotides tels que TATATATA, afin d'augmenter l'efficacité de l'amplification et éviter le mauvais amorçage (Álvarez-Fernandez, 2013).

2_5_ La séquence à l'extrémité 3' :

La position 3' terminale d'amorces sélectionnée est essentiel pour contrôler les erreurs d'amorçage (Álvarez-Fernandez, 2013), dont la présence des résidus G et C assure une meilleur fixation grâce aux liaisons d'hydrogène fortes ce qui induits à la bonne amplification de ces amorces.

3_ La recherche de la séquence de référence du gène d Interleukine 4 :

La conception d'amorce du gène codant la protéine d interleukine 4 commence par la recherche du gène d interleukine 4 sur la base de données ensembl à l'aide du site www.ensembl.org

La figure ci-dessous montre la séquence et la description du gène codant pour l'interleukine 4 sur le site « ensembl.org »

Gene: IL4 ENSG00000113520

Description	interleukin 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6014]
Gene Synonyms	BCGF-1, BCGF1, BSF1, IL-4, MGC79402
Location	Chromosome 5: 132,673,986-132,682,678 forward strand. GRCh38:CM000667.2
About this gene	This gene has 4 transcripts (splice variants), 122 orthologues and is a member of 1 Ensembl protein family .
Transcripts	Show transcript table

Marked-up sequence

[Download sequence](#) [BLAST this sequence](#)

Exons **IL4 exons** All exons in this region
Markup loaded

```
>chromosome:GRCh38:5:132673386:132683278:1
CCTGCTGGGACCCAACTAGGCCTCACCTGATACGACCTGTCTCTCAAACACCTAAA
CTTGGGAGAACATTGTCCCCAGTGTGGGGTAGGAGAGTCTGCCTGTTAATTCGCCTCT
ATGCAGAGAAGGAGCCCCAGATCAGCTTTTCCATGACAGGACAGTTTCCAAGATGCCACC
TGTACTTGGGAGAAGCCAGGTTAAAATACTTTTCAAGTAAAACCTTTCTTGATTAATCTCT
ATCTTTCCCGAGGAGACTSCATTACACAAATTCGACACCTGTGGCCTCTCCCTTCTA
TGCRAAGCRAAAGCCAGCAGCAGCCCAAGCTGATRAASATTAATCTAARGAGCRAATTA
TGGTGTAATTTCTATGCTGAACCTTTGTAGTTAATTTTTAAAAGGTTTCATTTCTCT
ATTGGTCTGATTTACAGGAACATTTTACCTGTTTGTGAGGCATTTTTCTCTGGAAGA
GAGGTGCTGATTTGGCCCAAGTGAAGTACCAATCTGGTGTAAACGAAAATTTCCAATGTAAA
CTCATTTTCCCTCGGTTTCAGCAATTTAATCTATATATAGAGATATCTTTGTCAGCAT
TGCATGTTAGCTTCTCTGATAACTAATTTGCCCTCACATTTGTCAGTCAAATCGACACC
TATTAATGGGTCTCACCTCCCACTGCTTCCCTCTGTTCTTCTGCTAGCATGTGCCG
GCAACTTTGTCCACGGACACAAGTGCATATCACCTTACAGGAGATCATCAAACCTTTGA
ACAGCCTCACAGAGCAGAAGGTGAGTACCTATCTGGCACCATCTCCAGATGTTCTGGT
```

Figure 2.1 : la séquence du gène codant l'interleukine 4 sur le site ensembl.org.

La figure représente une partie de la séquence du gène d'interleukine 4 qui a été trouvée sur la base des données « ENSEMBL », tandis que :

- Les bases représentées en noir sont les séquences non codantes dites : les introns.
- Les bases représentées en rouge sont les séquences codantes et dites : les exons.

La séquence de gène d'interleukine 4 est copiée dans un document Word, puis une séquence de ce gène est encadrée afin de simplifier la recherche des amorces sur le primer comme montré la figure ci-dessous.

```
TGAGGTCAGCCAGGCTGTCCAAAGTGCACCTCCCTGAGCCACTGGCAGACACACTCAGCRGC
CAGAGCTAGACAGGCAGGTGGTAGGAGTCCAGGGCCACGGCAGGGATGGAGTGTGCCCCC intron 3
CTCGCTGCGATACCAGAGCACTAAAACGTTAAAGCCCTTGCACATAAAGCTGCCCTTAGGA
TGCAATCTTTTAAAGTTTTTCCATTTAATGCAGACTCTTTTCAATTCITATTTTATCCTT
GTTTCTTTTAGAAAAGTCCTTTCAAAAATATCTTTAGAGGGTTTTTCTATACTATGTGG
C
CATATACGGGTCAAATTAAGTTTAAATTTCCAGGCTCCAAGCCAGCGTTTCAGAAAAT
CTCACCAAGGTTTGTGGTAAAAGAAGCARRAGGGCTGACTTTTTGGTTTTCTTGAATCTCA
CTGTTCCCTCTGCACCAGCATGCATGCTGCCCACTCCAGACACACAGGCACCATCTGC axone 3
CGCCCCCATCAGCCCGTGTCCCTTCCACTCGACTCGCCTACAAAGCCCAGAGAGTCT
GTTTCTTGGCCCCAGAGCCCAAAGATACTGACACACTTTTACATTTCCAAGTGAATCA
GGAAACGAGGAGTGAATCTCAGTCAGTTCAATTAAGTAAATGTCITTTCTAACCGCTCTGCC
ATGGGACATCACGCCCCACAGGGGAAAGGGGAAGCTTCTGTAGCCTGGGATTTCTGGTGCC
TCAGTCTGGGTCTAGACTTTCTGAAAAACGTTAAAATATGAACTGCATTCTAGAAAT
TAGCCTACATAAATAAGAGATGAACACAAAGATTCTATAGTTTACTCACTGCCGCTTAT
TTACAGAAGCAAAAATCTGCCACGATAGGGGCTGACAAATGACAGTACCCTGTGCAAT intron 4
```

Figure 2.2 : la séquence de gène d'interleukine 4 d'intérêt copiée dans un document Word.

4_ Le design primer :

Afin de trouver les amorces souhaitables, nous avons utilisé le logiciel Primer blast fournis par le site www.ncbi.nlm.nih.gov qui se trouve sur la base de données NCBI comme la figure montre.

Primer-BLAST A tool for finding specific primers

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

Reset page Save search parameters Retrieve recent results Publication Tips for finding specific

PCR Template

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

Range

Forward primer From To

Reverse primer From To

Or, upload FASTA file Aucun fichier choisi

Primer Parameters

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

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

Min Max

Figure 2.3 : L'outil Primer blast.

La séquence d'intérêt doit être copiée dans le "Primer blast", puis on change quelques paramètres afin que l'outil nous conçoît les amorces recherchées.

Primer-BLAST A tool for finding specific primers

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

Reset page Save search parameters Retrieve recent results Publication Tips for finding specific

PCR Template

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

Range

Forward primer From To

Reverse primer From To

Or, upload FASTA file Aucun fichier choisi

```
CCATATACGGGTCAAAATTAAGTTAATTTCCAGGCTCCAAGCCAGCGTTTCAGAAAAATCTCACCAAGTTTGTGGTAAA
AGAAGCAAAGGGCTGACTTTTGGTTTTCTTGAATCTCACTGTTCCCTCTGCAGCAGCATGCATGCTGCCACCTCCAGA
CACACAGGCACCATCTGCCGCCCCCATCAGCCCGTGTCCCTTCCACCTCGACTCGCCTACAAAGCCAGAGAGGTCTGTT
TCTTGGCCCCCAGAGCCCAAGATACTGACACACTCTTACATTTCCAACCTAGAATCAGGAACGAGGAGTGACTCTCAGTCA
GTTTCATTAAGTAAATGTCTTTCTAACCGCTCTGCC
```

Figure 2.4: La séquence du gène d_{il_4} copiée sur le logiciel Primer blast.

Le choix des paires d'amorces obtenues par le primer blast doit répondre aux critères précédents ainsi en choisissant le couple d'amorce qui donne le moins de produits aspécifiques afin d'assurer l'amplification de produit spécifique d'intérêt (IL₄).

1_ Résultats de conception des amorces « Primer Blast » :

Les résultats obtenus par le logiciel Primer Blast sont montrés dans la figure ci-dessous :

Primer pair 3

	Sequence (5'>3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCAAAGGGCTGACTTTTTGGT	Plus	21	86	106	59.86	47.62	5.00	0.00
Reverse primer	TGAGAGTCACTCCTCGTTCCT	Minus	21	320	300	59.93	52.38	7.00	0.00
Product length	235								

Products on potentially unintended templates

>[NC_000005.10](#) Homo sapiens chromosome 5, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 235
Features flanking this product:
[interleukin-4 isoform 1 precursor](#)
[interleukin-4 isoform 2 precursor](#)

Forward primer 1 GCAAAGGGCTGACTTTTTGGT 21
Template 132677731 132677751

Reverse primer 1 TGAGAGTCACTCCTCGTTCCT 21
Template 132677965 132677945

>[NC_000023.11](#) Homo sapiens chromosome X, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 3639
Features flanking this product:
[21646 bp at 5' side: protein SSX2 isoform a](#)
[21648 bp at 3' side: protein SSX2 isoform a](#)

Reverse primer 1 TGAGAGTCACTCCTCGTTCCT 21
Template 52731032 ...CTC.....G..... 52731012

Reverse primer 1 TGAGAGTCACTCCTCGTTCCT 21
Template 52727394 ...CTC.....G..... 52727414

product length = 2632
Features flanking this product:
[62487 bp at 5' side: arylsulfatase F isoform X3](#)
[132042 bp at 3' side: matrix-remodeling-associated protein 5 precursor](#)

Forward primer 1 GCAAAGGGCTGACTTTTTGGT 21
Template 132677731 132677751

Figure 3.1 : résultats de conception des amorces par le Primer Blast.

2_ Interprétation des résultats :

La base de données Ensembl.org nous fournit le gène d'interleukine 4 qui est composé de 5 axons et 6 introns.

Dans notre recherche nous étions intéressés précisément d'axons 3, lorsque les deux exons qu'elle précède fournissent des amorces dont les produits spécifiques ont une taille moins de 1000 pb qui peuvent induire une amplification de séquences non spécifiques de notre gène d'intérêt.

Pour cela 10 paires d'amorces ont été conçues par le Primer blast dont la 3-ème paire répond aux critères requis, précisés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 3.1: une comparaison entre l'amorce obtenus et les amorces idéal pour un PCR.

Critères		Longueurs	Température de fusion	Teneurs en GC	Produit spécifique	Produits aspécifiques
Taux optimale		18 à 24 Nucléotides	56 à 62 c°	40 à 60 %	Inferieure a 1000 pb	Supérieure à 1000 pb
Notre amorce	Amorce sens	21 Nucléotides	59.86 c°	47.62 %	235 paires de bases	Les 4 produits aspécifiques mesurent plus que 2000 pb
	Amorces anti-sens	21 Nucléotides	59.93 c°	52.38 %		

Le pair d'amorce qu'on a choisi répond aux critères d'une bonne paire d'amorces, dont la taille de produit spécifique est de 235 pb, alors que la taille des 4 produits aspécifiques est supérieurs à 2000 pb qui est généralement difficile à être séquencer par la PCR, donc le pair d'amorces conçus par le Primer Blast est bien spécifique à notre gène d'intérêt.

La température de fusion de cette amorce est environ 59 c° donnera un meilleur résultat pour une longueur de 21 nucléotides, une teneur en GC situe entre 40 à 60 % ce qui augmente la spécificité ainsi que l'efficacité de l'amplification.

3_ Confirmation des résultats :

Afin de confirmer les résultats conçus par le Primer Blast, un site de la bio-informatique est utilisé « www.genome.ucsc.edu »

UCSC In-Silico PCR

Genome: Assembly: Target: Forward Primer: Reverse Primer:

Max Product Size: Min Perfect Match: Min Good Match: Flip Reverse Primer:

About In-Silico PCR

In-Silico PCR searches a sequence database with a pair of PCR primers, using an indexing strategy for fast performance. See an example [video](#) on our YouTube channel.

Configuration Options

Genome and Assembly - The sequence database to search.
Target - If available, choose to query transcribed sequences.
Forward Primer - Must be at least 15 bases in length.
Reverse Primer - On the opposite strand from the forward primer. Minimum length of 15 bases.
Max Product Size - Maximum size of amplified region.
Min Perfect Match - Number of bases that match exactly on 3' end of primers. Minimum match size is 15.
Min Good Match - Number of bases on 3' end of primers where at least 2 out of 3 bases match.
Flip Reverse Primer - Invert the sequence order of the reverse primer and complement it.

Output

When successful, the search returns a sequence output file in fasta format containing all sequence in the database that lie between and include the primer pair. The fasta header describes the region in the database and the primers. The fasta body is capitalized in areas where the primer sequence matches the database sequence and in lower-case elsewhere. Here is an example from human:

```
>chr22:31000551+31001000 TAACAGATTGATGATGCATGAAATGGG CCCATGAGTGGCTCCTAAAGCAGCTGC
TtAcAGATTGATGATGCATGAAATGGGggggtggcccggggg*gggggggg*ga
gactgcaggaaggcggggctggttcaaacagccttttgctccccc
```

Figure 3.2 : site de confirmation des amorces In-Silico PCR.

Le processus de confirmation nous donne le locus du gène d'interleukine 4 sur le chromosome 5 qui nous confirme la spécificité des amorces a notre gène d'intérêt.

The screenshot displays the UCSC In-Silico PCR tool interface. At the top, there is a navigation bar with links for Genomes, Genome Browser, Tools, Mirrors, Downloads, My Data, Projects, Help, and About Us. Below this, the tool title 'UCSC In-Silico PCR' is shown. The main content area displays the following information:

```
>chr5:132677731+132677965 235bp GCAAAGGGCTGACTTTTTGGT TGAGAGTCACTCCTCGTTCCT
GCAAAGGGCTGACTTTTTGGTtttttgaatctcactgttccctctgcag
cagcatgcatgtctgccacctccagacacacaggcaccatctgccgcc
cccatcagccgtgtccctccacctgactcgcctacaagcccagaga
ggctgttttggccccagagcccaagatactgacacactttacat
ttccaactagaatcAGGAACGAGGAGTCACTCTCA
```

Below the sequence, the 'Primer Melting Temperatures' section is visible, showing:

```
Forward: 62.7 C gcaaaggctgactttttgg
Reverse: 59.0 C tgagagtcactcctcgttcct
```

A note at the bottom states: 'The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration. The code to calculate the melting temp comes from [Primer3](#).'

Figure 3.3: confirmation des résultats.

4_ Perspectives :

Nous avons conçu, le couples d'amorces spécifiques du gène d'interleukine 4 par les méthodes de la bio-informatique, pour que plus tard cette amorce fera l'objectif de nombreux études réalisées par la technique de la PCR chez les sujets jeunes atteints d'asthme allergique.

L'étude moléculaire du gène codant pour l'interleukine 4 par l'analyse et la quantification par la réaction de polymérase en chaîne peut déterminer au future l'effet de la sensibilisation allergique sur la gravité, la réponse au traitement, et le pronostic d'asthme allergique, ainsi peuvent induire à la prévention de l'asthme allergique par la prévention de la sensibilisation et par le ciblage de certaines molécules et des effecteurs immunitaires intervenant au cours l'inflammation des branche respiratoires comme des nouveaux cibles thérapeutiques , pour cela la détermination des bonnes paires d'amorces est nécessaire pour effectuer la PCR afin de réaliser ces études.

1_ Discussion :

Le gène d'interleukine 4 est impliqué dans une variété des maladies respiratoires particulièrement l'asthme allergique éosinophilique chez les enfants, l'étude moléculaire de gène d'interleukine 4 par la PCR en utilisant la conception des amorces permet de déterminer la présence et la concentration de la protéine et son effet sur le profil anti inflammatoire au cours de l'asthme allergique pédiatrique.

Apparemment les chercheurs utilisent la PCR afin d'étudier l'effet de l'interleukine 4 dans plusieurs maladies et confirment ces résultats, la technique de la PCR montre aussi la possibilité d'amplifier un même fragment d'ADN à partir de plusieurs amorces conçus par le logiciel Primer Blast comme montre le tableau ci-dessous :

Tableau 4.1 : l'étude des différentes amorces de gène d'interleukine 4 conçus par le Primer Blast pour la technique de PCR (Rt-PCR).

Amorces 5'3'	Test	But d'étude	Références
Sens : GCACCGAGTTGACCGTAACA Anti-sens : CCAACGTA CTCTGGTTGGCT	Rt-PCR	Déterminer l'importance des niveaux d'IL-4 chez les patients souffrant d'asthme et / où Rhinite.	DOI: 10.2217 /imt-2016-0131
Sens : CAAGCAGCTGATCCGATTCC Anti-sens : GGAATTCAAGCCC GCCA	Rt-PCR	Prouver l'association entre les cytokines pro et anti-inflammatoires dans prééclampsie	DOI: 10.1002/jcla.22834
Sens : CTCATAGCAGCCTCCACCTC anti-sens : GCCCAGAAGTTGAGACAAG	Rt-PCR	L'interleukine-4 libérée des fibroblastes gingivaux humains réduit l'ostéoclastogenèse	DOI:10.1016/ j.archoralbio. 2016.08.024
Sens : CCACGGACACAAGTGCGATAT Anti-sens : CGTAACAGACATCTTTGCTGCC	Rt-PCR	Effets des extraits d'eau combretum sur Production et expression d'IL-4	DOI :10.2101 0/cvajtcam.v 14i1.32
Sens : GGCTTCCAGGGTGCTTCGCAA Anti-sens : GTGGACTCATTACGGTGCAGC	Rt-PCR	La gravité de la lésion médullaire détermine le gène inflammatoire Modèle d'expression après l'immunisation avec des peptides dérivés de neurones	DOI :10.1007 /s12031-018-1077-3

Conclusion

L'asthme allergique est devenu, au bout des dernières années le phénotype le plus fréquent des inflammations respiratoires autour le monde particulièrement chez les sujets les plus jeunes, qui est caractériser par une sensibilisation par un allergène favorisant les réponses en Th2 et la secretion de la cytokine anti inflammatoire, l'interleukine 4 par les effecteur immunitaire participant dans l'inflammation des tissus des voies respiratoires , et puisque la maladie est chronique et parfois devienne incontrôlable par les méthodes pharmacologiques, l'utilisation de la technique de la PCR devienne nécessaire pour étudier l'effet de l'interleukine 4 sur la progression de la maladie.

L'étude de gène codant pour l'interleukine 4 par la technique de la PCR nécessite de concevoir les bonnes paires d amorces qui répond aux critères mentionner dans notre étude, pour cela il existe plusieurs méthodes de la bio-informatique qui nous facilitent notre choix d'amorce idéale pour une meilleur amplification de notre séquence du gène d'intérêt.

Références bibliographiques :

1. Aggarwal, R., Jain, A.K., Mittal, P., Kohli, M., Jawanjal, P., and Rath, G. (2019). Association of pro- and anti-inflammatory cytokines in preeclampsia. *J Clin Lab Anal* 33, e22834.
2. Al dandachi, G. (2013). Faisabilité d'un protocole de suivi des patients asthmatiques sortant des urgences après une crise. Université Paris Diderot - Paris 7.
3. Álvarez-Fernández, R. (2013). Explanatory Chapter. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 1–21.
4. Anand, S., and Mande, S.S. (2018). Diet, Microbiota and Gut-Lung Connection. *Front. Microbiol.* 9, 2147.
5. Arrieta MC, Arevalo A, Stiemsma L, Dimitriu P, Chico ME, Loor S, et al. (2018). Associations between infant fungal and bacterial dysbiosis and childhood atopic wheeze in a nonindustrialized setting. *J Allergy Clin Immunol*, 142 : 424-34. E10.
6. Arrieta MC, Stiemsma LT, Dimitriu PA, Thorson L, Russell S, Yurist-Doutsch S, et al. (2015). Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. *Sci Transl Med*,7 :307ra152.
7. Bacharier, L.B., and Guilbert, T.W. (2019). Key Issues in Pediatric Asthma. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 39, xv–xvi.
8. Calatayud-Sáez, F.M., Calatayud Moscoso del Prado, B., Gallego Fernández-Pacheco, J.G., González-Martín, C., and Alguacil Merino, L.F. (2016). Mediterranean diet and childhood asthma. *Allergologia et Immunopathologia* 44, 99–105.
9. Cecchi L, D'Amato G, Annesi-Maesano I. External exposome and allergic respiratory and skin diseases. (2018). *J Allergy Clin Immunol*, 141(3) :846–57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2018.01.016> [Review. PubMed PMID: 29519451].
10. Chai, R., Liu, B., and Qi, F. (2017). The significance of the levels of IL-4, IL-31 and TLSP in patients with asthma and/or rhinitis. *Immunotherapy* 9, 331–337.
11. Claude, R. (2008). Effets pro-inflammatoire de l'interleukine 4 sur les neutrophiles humains et dans un modèle d'inflammation in VIVO. Université de Québec INRS institut Armand Frappier.
12. Delmas MC, Guignon N, Leynaert B, Moisy M, Marguet C, Fuhrman C. (2017). [Increase in asthma prevalence among young children in France]. *Rev Mal Respir*, 34(5) :525– 34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mmr.2016.09.002> [Epub 2016 Dec 2; French. PubMed PMID : 27919604].
13. Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M., and Dveksler, G.S. (1993). General concepts for PCR primer design. *Genome Research* 3, S30–S37.

14. Dunican EM, Fahy JV. (2015). The role of type 2 inflammation in the pathogenesis of asthma exacerbations. *Ann Am Thorac Soc*, 12 (suppl 2) : S144–49.
15. Finotto, S. (2019). Resolution of allergic asthma. *Semin Immunopathol* 41, 665–674.
16. Fujimura KE, Sitarik AR, Havstad S, Lin DL, Levan S, Fadrosch D, et al. (2016). Neonatal gut microbiota associates with childhood multisensitized atopy and T cell differentiation. *Nat Med*, 22 :1187-91.
17. Gandhi NA, Pirozzi G, Graham NMH. (2017). Commonality of the IL-4/IL-13 pathway in atopic diseases. *Expert Rev Clin Immunol*, 13 :425–437.
18. García, E., Silva-García, R., Flores-Romero, A., Blancas-Espinoza, L., Rodríguez-Barrera, R., and Ibarra, A. (2018). The Severity of Spinal Cord Injury Determines the Inflammatory Gene Expression Pattern after Immunization with Neural-Derived Peptides. *J Mol Neurosci* 65, 190–195.
19. GINA patient guide print Pocket. (2019). Global initiative for asthma, www.gonasthma.org.
20. Gour N, Wills-Karp M. (2015). IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease. *Cytokine*,75(1) :68–78.
21. Haktanir Abul, M., and Phipatanakul, W. (2019). Severe asthma in children: Evaluation and management. *Allergology International* 68, 150–157.
22. Hawkins, S.F.C., and Guest, P.C. (2017). Multiplex Analyses Using Real-Time Quantitative PCR. In *Multiplex Biomarker Techniques*, P.C. Guest, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 125–133.
23. Ihuoma H, Belgrave DC, Murray CS, Foden P, Simpson A, Custovic A. (2018). Cat ownership, cat allergen exposure, and trajectories of sensitization and asthma throughout childhood. *J Allergy Clin Immunol*, 141(2). <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2017.09.030> [820– 822.e7; Epub 2017 Oct 28; PubMed PMID: 29111216; PubMed Central PMCID: PMC5792051].
24. J. Banchereau. (1990). Interleukine 4, *médecine/sciences*, 6 : 946-53.
25. Junttila, I.S. (2018). Tuning the Cytokine Responses : An Update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 Receptor Complexes. *Front. Immunol.* 9, 888.
26. Karo-Atar, D., Bitton, A., Benhar, I., and Munitz, A. (2018). Therapeutic Targeting of the Interleukin-4/Interleukin-13 Signaling Pathway: In *Allergy and Beyond*. *BioDrugs* 32, 201–220.
27. Kelly-welch, A. E., E. M. Hanson, M. R. Boothy et A. D. Keegan. (2003). Interleukin 4 and interleukin 13 signaling connections maps. *Science*, Vol. 300, p. 1527-1528.
28. Kercksmar, C.M., and Shipp, C. (2019). Management/Comorbidities of School-Aged Children with Asthma. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 39, 191–204.

29. Lambrecht, B.N., Hammad, H., and Fahy, J.V. (2019). The Cytokines of Asthma. *Immunity* 50, 975–991.
30. Leynaert, B., Le Moual, N., Neukirch, C., Siroux, V., and Varraso, R. (2019). Facteurs environnementaux favorisant le développement d'un asthme. *La Presse Médicale* 48, 262–273.
31. Liang HE, Reinhardt RL, Bando JK, Sullivan BM, Ho IC, Locksley RM. (2011). Divergent expression patterns of IL-4 and IL-13 define unique functions in allergic immunity. *Nat Immunol*, 13(1) :58–66.
32. Loftus, P.A., and Wise, S.K. (2016). Epidemiology of asthma: Current Opinion in *Otolaryngology & Head and Neck Surgery* 24, 245–249.
33. Matsuda, K. (2017). PCR-Based Detection Methods for Single-Nucleotide Polymorphism or Mutation. In *Advances in Clinical Chemistry*, (Elsevier), pp. 45–72.
34. McGeachie MJ, Yates KP, Zhou X, et al. (2016). Patterns of growth and decline in lung function in persistent childhood asthma. *N Engl J Med*, 374 : 1842–52.
35. Mims, J.W. (2015). Asthma: definitions and pathophysiology: Asthma: definitions and pathophysiology. *International Forum of Allergy and Rhinology* 5, S2–S6.
36. Mullis KB. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am*, 262 :56–61.
37. Mullis KB, Faloona FA. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155 :335–350.
38. Obiri NI, Debinski W, Leonard WJ, Puri RK. (1995). Receptor for interleukin 13. Interaction with interleukin 4 by a mechanism that does not involve the common gamma chain shared by receptors for interleukins 2, 4, 7, 9, and 15. *J Biol Chem*, 270(15) :8797–804.
39. Owens L, Laing IA, Zhang G, Turner S, Le Souef PN. (2018). Prevalence of allergic sensitization, hay fever, eczema, and asthma in a longitudinal birth cohort. *J Asthma Allergy*, 11 :173–80.
40. Papi, A., Brightling, C., Pedersen, S.E., and Reddel, H.K. (2018). Asthma. *The Lancet* 391, 783–800.
41. Park LS, Friend D, Sassenfeld HM, Urdal DL. (1987). Characterization of the human B cell stimulatory factor 1 receptor. *J Exp Med*, 166(2) :476–88
42. Parulekar, A.D., Kao, C.C., Diamant, Z., and Hanania, N.A. (2018). Targeting the interleukin-4 and interleukin-13 pathways in severe asthma: current knowledge and future needs. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 24, 50–55.
43. Paul, W.E. (2015). History of interleukin-4. *Cytokine* 75, 3–7.
44. Pocket Guide for Health professionals updated. (2020). Global initiative for asthma, www.ginasthma.org.

45. Russell RJ, Brightling C. (2017). Pathogenesis of asthma: implications for precision medicine. *Clin Sci (Lond)*, 131 : 1723–35.
46. Samie, A., and Madzie, N. (2016). Effects of Combretum Hereroense and Canthium water extracts on production and expression of interleukin 4. *Ajtcam* 14, 302–309.
47. Schatz, M., and Rosenwasser, L. (2014). The Allergic Asthma Phenotype. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* 2, 645–648.
48. Sequeira, A., Maisey, K., and Imarai, M. (2017). Interleukin 4/13 receptors: An overview of genes, expression and functional role in teleost fish. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 38, 66–72.
49. Stiemsma LT, Arrieta MC, Dimitriu PA, Cheng J, Thorson L, Lefebvre DL, et al. (2016). Shifts in *Lachnospira* and *Clostridium* sp. In the 3-month stool microbiome are associated with preschool age asthma. *Clin Sci*, 130 :2199-207.
50. Touti, soumia. (2013). Conception des amorces encadrant le SNP rs6232 du gène PCSK1 associé à l'obésité. Abou Baker Belkaid.
51. Ujiie, Y., Karakida, T., Yamakoshi, Y., Ohshima, T., Gomi, K., and Oida, S. (2016). Interleukin-4 released from human gingival fibroblasts reduces osteoclastogenesis. *Archives of Oral Biology* 72, 187–193.
52. Ul-Haq, Z., Naz, S., and Mesaik, M.A. (2016). Interleukin-4 receptor signaling and its binding mechanism: A therapeutic insight from inhibitors tool box. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 32, 3–15.
53. Underner, M., Perriot, J., Peiffer, G., and Meurice, J.-C. (2015). Influence du tabagisme sur le risque de développement de l'asthme. *Revue des Maladies Respiratoires* 32, 110–137.
54. Vael C, Vanheirstraeten L, Desager KN, Goossens H. (2011). Denaturing gradient gel electrophoresis of neonatal intestinal microbiota in relation to the development of asthma. *BMC Microbiol*, 11 :68.
55. Vael C, Nelen V, Verhulst SL, Goossens H, Desager KN. (2008). Early intestinal *Bacteroides fragilis* colonisation and development of asthma. *BMC Pulm Med*, 8 :19.
56. Van Nimwegen FA, Penders J, Stobberingh EE, Postma DS, Koppelman GH, Kerkhof M, et al. (2011). Mode and place of delivery, gastrointestinal microbiota, and their influence on asthma and atopy. *J Allergy Clin Immunol*, 128 : 948-55, e1-3
57. Ver Heul, A., Planer, J., and Kau, A.L. (2019). The Human Microbiota and Asthma. *Clinic Rev Allerg Immunol* 57, 350–363.
58. Zahran HS, Bailey CM, Damon SA, Garbe PL, Breyse PN. (2018). Vital signs: asthma in children e United States, 2001-2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 67 : 149e55.

59. Zimmermann, P., Messina, N., Mohn, W.W., Finlay, B.B., and Curtis, N. (2019). Association between the intestinal microbiota and allergic sensitization, eczema, and asthma: A systematic review. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 143, 467–485.

ملخص:

الربو التحسسي لدى الأطفال هو اضطراب تنفسي، حيث يؤدي التعرض لمسببات الحساسية إلى استجابة مناعية مضادة للالتهاب مما يؤدي إلى إفراز إنترلوكين 4، ويخضع التعبير عن هذا السيتوكين لعدة دراسات، حيث ان استخدام طرق البيولوجيا الجزيئية مثل تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل تعتبر خطوة أساسية في إجراء هذه الدراسات، واختيار أزواج التمهيدي المناسبة للتفاعل من خلال تصميم البادئات هي خطوة جد مهمة من أجل إنجاح الدراسة بواسطة هاته التقنية.

الكلمات الدالة:

الربو التحسسي، إنترلوكين 4، PCR، تصميمات أولية.

Résumé :

l'asthme allergique pédiatrique est un trouble respiratoire, pendant lequel l'exposition a un allergène induit a une réponse immunitaire via un profile anti inflammatoire provoquant la sécrétion de l'interleukine 4 , l'expression de cette cytokine fait l'objet de plusieurs études, dont l'utilisation des méthodes de la biologie moléculaire tels que la technique de la PCR est considérée comme un étape essentiel pour réaliser ces études, le choix des bonnes pairs d amorces pour la réaction (PCR) par la conception des amorces est une étape non négligeable afin d'effectuer l'étude.

Mots clés :

Asthme allergique, interleukine 4, PCR, conceptions d amorces.

Abstract:

Pediatric allergic asthma is a respiratory disorder, during which the exposure to an allergen induces an immune response using an anti-inflammatory profile causing the secretion of interleukin-4, the expression of this cytokine is the subject of several studies , of which the use of molecular biology methods such as the PCR technique is considered an essential step in performing these studies, the choice of the right primer pairs for the reaction (PCR) by the design of the primers is a step important to conduct the study.

Key words:

Allergic asthma, interleukin 4, PCR, primer design.