

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

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

Département de Biologie

Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et d'Immunologie W04144100

MEMOIRE

Présenté par

Kadri fatima zohra

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Immunologie

Thème

Conception des amorces pour le gène de L'IL-10 pour l'étude de son profil anti-inflammatoire au cours de l'asthme allergique pédiatrique

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

Président	ARIBI Mourad	Professeur	Université de Tlemcen
Encadreur	Chahrazed El MEZOUAR	MCA	Université de Tlemcen
Examinatrice	NOUARI Wafa	MCB	Université de Tlemcen

Année universitaire 2019/2020

Résumé

Introduction : IL-10 joue un rôle anti-inflammatoire au cours de l'asthme allergique, un niveau élevé d'IL-10 a un effet protecteur contre l'hyperréactivité et l'inflammation des voies respiratoires, cependant l'expression du gène de l'IL-10 au cours de l'asthme allergique suggère des études approfondies pour que plus tard cette IL-10 fasse l'objet d'une étude sur la cible thérapeutique dans le traitement de l'asthme allergique.

Objectif : Ce projet de thèse de master a pour objectif de concevoir des amorces du gène de l'IL-10 pour l'étude de profile anti-inflammatoire au cours de l'asthme allergique.

But : Le but de cette étude est de concevoir des amorces spécifiques encadrant le gène d'IL10 afin de réaliser par la suite une PCR pour évaluer et détecter l'expression du gène de l'IL-10 au cours de l'asthme allergique pédiatrique.

Matériel et méthodes : Les séquences génomiques du gène de l'interleukine 10 ont été obtenues grâce à la base de données Ensembl. Le logiciel Primer-Blast a été utilisé pour concevoir des amorces spécifiques encadrant une partie du gène de l'IL-10.

Résultats : Dans un premier temps, des amorces aspécifiques ont été obtenus, ce qui nous a obligés à élargir la séquence à amplifier. Les amorces obtenues sont spécifiques du gène de l'IL-10 et présente des caractéristiques optimales pour le bon déroulement d'une PCR

Conclusion : À travers cette étude, nous avons pu concevoir avec spécificité le couple d'amorce qui encadre le gène de l'IL-10 qui seront indispensable pour tout étude concernant le gène du IL-10, ce dernier joue un rôle anti-inflammatoire au cours de l'asthme allergique et il peu avoir un potentiel thérapeutique dans le traitement de l'asthme allergique.

Mots clés

L'asthme allergique pédiatrique, interleukine 10, conception d'amorce, PCR.

Abstract

Introduction: IL-10 plays an anti-inflammatory role in allergic asthma, a high level of IL-10 has a protective effect against hyperreactivity and inflammation of the airways, however the expression of the gene of IL-10 in allergic asthma suggests further studies so that IL-10 can later be investigated as a therapeutic target in the treatment of allergic asthma.

Objective: Our objective is to design primers for the IL-10 gene for the study of the anti-inflammatory profile in pediatric allergic asthma.

Aim: The aim of this study is to design a good pair of specific primers flanking the IL10 gene in order to subsequently carry out a successful PCR to evaluate and detect the expression of the IL-10 gene during pediatric allergic asthma.

Materials and methods: The genomic sequences of the interleukin 10 gene were obtained from the Ensembl database. Primer-Blast software was used to design specific primers flanking part of the IL-10 gene.

Results: Firstly, nonspecific primers were obtained, which forced us to expand the sequence to be amplified. The primers obtained are specific for the IL-10 gene and exhibit optimal characteristics for the proper conduct of a PCR.

Conclusion: Through this study, we were able to design with specificity the primer pair which surrounds the IL-10 gene which will be essential for any study concerning the IL-10 gene, the latter plays an anti-inflammatory role. in allergic asthma and may have therapeutic potential in the treatment of allergic asthma.

Keywords: Pediatric allergic asthma, interleukin 10, primer design, PCR.

Keywords

Pediatric Allergic Asthma, Interleukin 10, Primer Design, PCR.

ملخص

المقدمة

يلعب IL10 دورًا مضادًا للالتهابات في الربو التحسسي ، كما أن مستوى عال من IL10 له تأثير وقائي ضد فرط النشاط والتهاب الجهاز التنفسي، فلماذا التعبير عن الجين IL-10 أثناء الربو التحسسي لدى الأطفال يقترح مزيدًا من الدراسات بحيث يكون هذا -ii 10 لاحقًا موضوعًا لدراسة عن الهدف العلاجي من أجل علاج الربو التحسسي لدى الأطفال

الهدف

هدفنا هو تصميم البرايمرات الجيني IL10 لدراسة الملامح المضادة للالتهابات في الربو التحسسي لدى الأطفال

الإستهداف

الإستهداف من هذه الدراسة هو تصميم زوج جيد من البادئات المحددة المحيطة بجين IL-10 من أجل إجراء PCR ناجح لاحقًا لتقييم واكتشاف تعبير الجين IL10 أثناء الربو التحسسي لدى الأطفال

الوسائل و الطرق:

تم الحصول على التسلسلات الجينومية للجين IL10 من قاعدة بيانات ensembl. تم استخدام برنامج التمهيدي لتصميم برايمر محدد لتأطير جزء من الجين IL10

النتائج:

في البداية ، تم الحصول على بادئات غير محددة، أجبرتنا على تمديد التسلسل لتضخيمه. البادئات التي تم الحصول عليها محددة للجين IL-10 وتقدم الخصائص المثلى للتطور السليم لـ PCR

الإستنتاج:

من خلال هذه الدراسة ، تمكنا من تصميم الزوج التمهيدي الذي يحدد الجين IL-10 والذي سيكون ضروريًا لأي دراسة تتعلق بجين IL10، حيث يلعب هذا الأخير دورًا مضادًا للالتهابات في الربو. حساسية وقد يكون له إمكانيات علاجية في علاج الربو التحسسي لدى الأطفال

الكلمات المفتاحية:

الربو التحسسي لدى الأطفال ، أنترلوكين 10 ، تصميم تمهيدي ، PCR

Avant propos

Avant toute chose, je remercie Allah qui m'a donné la volonté et la patience pour terminer ce modeste travail

Je tiens à remercier chaleureusement **Dr. Chahrazed ELMEZOUAR** de m'avoir orienté tout le long de ce travail. Ses remarques et conseils constructifs étaient très bénéfiques pour mon travail. Je vous remercie pour m'avoir encadré ainsi pour son encouragement et son soutien.

Mes sincères gratitudee à **Pr ARIBI Mourad** pour la qualité de son enseignement, ses conseils et son intérêt incontestable qu'il porte à tous les étudiants, qui m'a ouvert la porte pour cette spécialité (Immunologie), ainsi pour m'avoir fait l'honneur d'accepter le président du jury, qu'il trouve ici mes sincères impressions de respect et de gratitude.

J'adresse mes plus sincères remerciements à **Dr. Wafa NOUARI** pour m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail, qu'elle trouve ici mes sincères impressions de respect et de gratitude.

Je tiens à remercier profondément les membres du jury qui me font le grand honneur d'évaluer ce travail.

Et pour terminer, je remercie mes chers parents qui m'ont toujours poussé et motivé dans mes études, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mon parcours universitaires.

Je dédie ce travail à ma cher famille, mais parents en premier, ma sœur Hidayette, mon frère Adel, mon neveu shahine, ma grand mère Zohra , mon beau frère Abdou , à toutes mes chères copines et surtout ma sœurette Ghizlaine, à mes amies, et toutes les personnes que j'estime.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
Résumé en Arabe	v
Avant-propos	vi
Table des matières	vii
Liste des figures	x
Liste des tableaux	xi
Liste des abréviations	xii
Introduction	1
Chapitre 1. Revue de la littérature	
1.1. L'asthme allergique pédiatrique	3
1.1.1. La prévalence de l'asthme allergique pédiatrique	4
1.1.2. La pathogénèse de l'asthme allergique	4
1.1.3. Histopathologie de l'asthme allergique pédiatrique	6
1.1.4. L'étiologie de l'asthme allergique pédiatrique	6
1.1.5 .Le diagnostic de l'asthme allergique	7
1.1.5.1. Examen physique	8
1.1.5.2. Les critères pour faire de diagnostic de l'asthme allergique	9
1.2. L'interleukine 10	10
1.2.1. Structure de l'interleukine 10	11
1.2.1.1. Structure de gène de l'interleukine 10	11
1.2.1.2. Structure de la protéine de l'interleukine 10	12
1.2.2. Source immunologique de l'interleukine 10	12

1.2.3. La signalisation de l'interleukine 10	13
1.2.4. Le profil anti-inflammatoire de l'IL-10 dans l'asthme allergique	14
1.2.5. L'interleukine 10 et l'asthme allergique	15
1.2.6. L'administration clinique de l'IL-10	16
1.3. La PCR (Polymérase chaîne Réaction)	17
1.3.1. Le principe de la PCR	17
1.3.2. Les acteurs de la PCR	17
1.3.3. Les étapes de la PCR	18
1.3.5. Les amorces	18
1.3.6. Conception des amorces pour la PCR	18
1.3.6.1. Les Choix des amorces de PCR	18
1.3.6.2. Les séquences d'amorces complémentaires	19
1.3.6.3. La séquence à l'extrémité 3	19
1.4. Problématique	20
Chapitre 2. Matériels et méthodes	
1. La séquence du gène de l'interleukine 10	21
2. L'outil de Primer –Blast	23
3. Analyse des résultats du primer Blast	24
Chapitre 3. Résultats	
1. Résultats de la conception des amorces	25
2. Confirmation des résultats	28
Chapitre 4. Discussion	29
Chapitre 5. Conclusion et perspective	30
Chapitre 6. Bibliographie	31

Liste des figures

Figure 1.1. La réaction inflammatoire dans l'asthme allergique	5
Figure 1.2. Les changements histopathologiques typiques de l'asthme chez les enfants	6
Figure.1.3. Localisation du gène IL-10 sur le chromosome 1	11
Figure .1. 4. Structure de l'interleukine 10 lié a son récepteur	12
Figure.1.5. Rôle de lymphocyte T régulateurs dans le contrôle de l'asthme allergique	13
Figure 1.6. La signalisation immuno-modulatrice de l'interleukine 10	14
Figure 2.1. Plateforme de la base de données Ensembl.	21
Figure 2.2. Introduction du gène de l'IL-10 dans la base de données Ensembl.	21
Figure 2.3. Code donnée pour le gène de l'IL-10.	22
Figure 2.4. la séquence du gène de l'IL-10 sur plateforme Ensembl.	22
Figure 2.5. Exemple 01 de la séquence du gène de l'IL-10.	23
Figure 2.6. Plateforme de base de données ncbi	23
Figure 2.7. Interface du logiciel Primer Blast	24
Figure 3.1. Représentation graphique des 10 paires d'amorces encadrent une partie du gène de l'IL-10	25
Figure 3.2. Représentation graphique des 10 nouvelles paires d'amorces encadrent une partie du gène de l'IL-10	25
Figure 3.3. Résultat du Primer blast montrant les caractéristiques de la paire d'amorces choisis	26
Figure 3.4. Les caractéristiques du couple d'amorce choisi	27
Figure 3.5. Paire d'amorce N° 3 (en vert) encadrent une partie de la séquence du gène de l'IL-10.	27
Figure 3.6. Confirmation des Résultats par le site UCSC in sillico PCR	28

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Les facteurs impliqués dans l'expression de l'asthme allergique Pédiatrique	7
Tableau 1.2. Les caractéristiques utilisées pour établir le diagnostic de l'asthme Selon GINA (global initiative for Asthma) 2020	9
Tableau.1.3. Homologues cellulaires de l'IL-10 humaine	10
Tableau.1.4. Les polymorphismes SNP de l'IL-10 associé à l'asthme pédiatrique	11
Tableaux.1.5. Les Fonctions biologiques de l'IL-10 compatibles avec son profile anti- inflammatoire	16

Liste des abréviations

A

Aa : Acide aminé

ADN : Acide désoxyribonucléique

APC : Cellule présentatrices d'antigène

C

CD : Cellule dendritique

CPA : Thermo fichier scientifique

CSIF : Bloqueur de la synthèse des cytokines humaine

F

FEV1 : Volume expiratoire forcé à 1s

FCV : Capacité vitale forcé

G

GMS : Facteur stimulant les colonies de granulocyte

H

HDM : Allergène des acariens

I

IGE : Immunoglobulines E

INF : Interféron

IL : Interleukine

IL-10 R : Récepteur de l'interleukine 10

IL1RN : Antagoniste des récepteurs de l'interleukine1

J

JAK1 : Kinase Janus

M

MC : cellule mastocyte

MB : membrane basale

MAP : Protéine kinase

N

NFKB : Nuclear facteur kappa B

NCIBI : National center for Biotechnology Information

O

OMS : L'organisation mondiale de la santé

P

PGD : Prostaglandine

Pb : Paire de base

PCR : Polymérase chaine réaction

S

STP : Teste cutané

STAT3 : Signal de l'activation de transcription 3

SOSC3 : Suppresseur de la signalisation des cytokines

SIT : immunothérapie spécifique à l'allergène

T

TH1: Lymphocyte T helper de type 1

TH2: Lymphocyte T helper de type 2

T reg : Cellule t régulatrice

TGF : Facteur de croissance transformant β

TNF : Facteur de nécrose tumorale

TyK2 : Tyrosine kinase

V

VEMS : volume expiratoire maximal par seconde

Introduction

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique hétérogène complexe avec plusieurs phénotypes. L'asthme allergique est le sous-ensemble de l'asthme induit par la sensibilisation et l'exposition aux aéroallergènes. C'est le phénotype le plus courant de l'asthme est le plus fréquent chez les enfants d'âge scolaire et les jeunes adultes (Lin et al. 2016). L'asthme allergique est parfois référé à l'asthme atopique en raison de l'association avec d'autres maladies atopiques telles que dermatite atopique, allergie alimentaire et rhinite, généralement prédisposés, l'exposition aux allergènes entraîne une sensibilisation allergique et le développement de l'asthme. De nombreux allergènes ambiants et intérieurs ont été impliqués dans le développement et l'exacerbation de l'asthme allergique pédiatrique, mais les allergènes d'intérieur ont la plus grande influence sur l'asthme allergique (Lin et al. 2016). En fait, les acariens (HDM), les animaux à fourrure, les cafards, les rongeurs et les moisissures représentent la grande proportion d'aéroallergènes de l'asthme allergique pédiatrique.

L'asthme dépendant des cellules Th2 est l'un des diagrammes moléculaires de l'asthme allergique, les lymphocytes Th2 jouent un rôle fondamental dans la pathogenèse de l'asthme allergique via la libération de cytokines, en particulier l'interleukine (IL) -4, IL-5 et IL13 (Richards et Stumpf 2018). Dans la pathogenèse de l'asthme allergique, nous accordons une attention particulière tout au long du rôle potentiel de l'IL-10 comme un facteur anti-inflammatoire de voie aérienne, qui peut avoir des effets immuno-modulatrice au cours de la pathologie de l'asthme allergiques Pédiatrique.

L'interleukine (IL) -10 est décrit comme une cytokine anti-inflammatoire importante en raison de ses effets dans la régulation négative sur la production de cytokines pro-inflammatoires des cellules th2 et ses potentiel de favoriser la résolution de l'inflammation pulmonaire (Schülke 2018). Par contre une diminution de la production d'IL-10 au cours de l'asthme allergique permettrait la synthèse sans opposition de cytokines pro-inflammatoires qui contribuant au développement et à la gravité de l'asthme allergique. En raison de ses effets largement anti-inflammatoires, l'IL-10 est une molécule très intéressante pour le traitement des maladies allergiques, où les patients atteints développent des réponses immunitaires exagérées, induites par l'immunoglobuline E (IgE) et Th2, contre des antigènes environnementaux, de nombreuses études soutiennent l'importance de l'IL10 dans la modulation des maladies y a compris l'asthme allergiques.

Introduction

La mise au point de la technique de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a révolutionné la biologie moléculaire et la médecine moléculaire (Saiki et al., 1985), c'est une technique utilisée in vitro pour amplifier à l'aide d'enzymes une région déterminée de l'ADN qui se trouve entre deux régions de séquence ADN connue, la PCR permet maintenant d'amplifier même une seule copie de gène à plusieurs exemplaires en quelques heures.

La conception des amorces est considérée comme le paramètre le plus important pour le succès de la PCR. Cependant, une amorce mal conçue peut empêcher le fonctionnement de la réaction PCR. La séquence d'amorce détermine plusieurs choses, telles que la position et la longueur du produit, sa température de fusion et finalement le rendement (Innis et Gelfand, 1994). Une amorce mal conçue peut conduire à une production faible, voire nulle, en raison d'une amplification non spécifique et/ou à la formation de dimères d'amorce, qui peuvent devenir suffisamment compétitifs pour inhiber la formation de produit.

Ainsi ce travail a pour objectif de concevoir des amorces qui encadrent le gène de l'IL10 pour l'étude de profile anti-inflammatoire au cours de l'asthme allergique.

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.1. L'asthme allergique pédiatrique

L'asthme allergique est une maladie qui se caractérise par une inflammation bronchique, causée par le conflit allergène-IgE est régulée par une hyperréactivité bronchique non spécifique, elle se manifeste globalement par des crises et des difficultés respiratoire (Lin et al. 2016). Chez les enfants sans asthme, les bronches sont suffisamment larges pour respirer facilement. Par contre, chez les enfants asthmatiques, l'inflammation bronchique permanente et la contraction des muscles provoquent une réduction du diamètre des bronches, ce qui rend la circulation de l'air plus difficile. 95% des enfants ont une cause d'allergie (Mastrorilli et al. 2016), cependant, l'exposition aux allergènes peut conduire à une variété de mécanismes biologiques, conduisant à de grandes quantités de molécules inflammatoires. Cela provoque une inflammation de la paroi bronchique, ce qui aide principalement à fermer partiellement les voies respiratoires. Les bronches gonflent alors et produisent des sécrétions épaisses. De plus, les muscles des bronches qui se contractent avec le bronchospasme, rendent la respiration difficile car l'air dans les poumons ne peut pas circuler librement.

La crise d'asthme allergique est définie par l'apparition soudaine de signes cliniques d'asthme (difficulté à respirer, respiration sifflante, toux, oppression thoracique), lorsque les allergènes déclenchent ces crises, il s'agit de l'asthme allergique ceci est lié à l'inhalation d'allergènes. L'inhalation commence à l'origine avant l'âge de 20ans ; elle représente plus de 2 /3 de l'asthme infantile, tandis que l'asthme adulte n'en représente que 1/3 (Biagini Myers et al. 2019). L'intensité peut être légère à sévère et peut mettre la vie en danger en cas d'attaque grave. La durée est généralement courte mais si les symptômes persistent pendant plus de 24 heures cela s'appelle une aggravation de l'asthme.

Les signes cliniques de l'asthme allergique résultent des réponses inflammatoires altérées qui provoquent une hypersécrétion de mucus, une hyperréactivité bronchique et une activation des granulocytes des voies respiratoires. L'asthme allergique est inspiré des observations selon lesquelles l'inflammation allergique a été entraînée par l'activité des cytokines Th2 Y a compris interleukine-4 (IL-4), IL-5 et IL-13 et que ces cytokines ont été mesurées à des concentrations élevées dans les poumons de patients asthmatiques et jouent des rôles pivotes dans la conduite des caractéristiques physiopathologiques de l'asthme allergique (Peters et Wenzel 2020).

L'asthme de type 2 est généralement observé en clinique sous forme d'asthme allergique à début précoce, d'asthme éosinophile tardif ou d'asthme induit par l'exercice. Ces patients sont généralement allergiques aux aéroallergènes courants, Elles ont tendance à répondre bien au traitement par gluco-corticostéroïdes ou par des produits biologiques, tels que les approches anti-immunoglobuline E (IgE), anti-interleukine-5 (IL-5) ou anti-IL-4 et anti-IL-13 (Barcik et al. 2020).

1.1.1. La prévalence de l'asthme allergique pédiatrique

L'organisation mondiale de la santé (OMS) a estimé qu'environ 300 millions de personnes souffrent d'asthme dans le monde et la prévalence de l'asthme allergique chez les enfants d'âge scolaire a été estimée dans la population générale de patients asthmatiques auprès de 50% (Dharmage, Perret, et Custovic 2019). Ces estimations sont basées sur la proportion des enfants asthmatiques qui présentent une sensibilisation positive démontrée par une immunoglobuline E (IgE) spécifique aux aéroallergènes.

L'asthme allergique est une maladie chronique avec un indice élevé et une faible mortalité globale. C'est la principale cause de maladie chronique et d'absentéisme scolaire chez les enfants. Bien que l'asthme commence généralement dans l'enfance, au cours de laquelle l'incidence et la prévalence sont élevées, il peut survenir à tout moment de la vie. Avant la puberté, l'incidence, la prévalence et le taux d'hospitalisation de cette maladie sont plus élevés chez les garçon que chez les filles, bien qu'il s'inverse à l'adolescence (Bollinger et al. 2019).

L'estimation de la prévalence de l'asthme chez les enfants est de 4.1% en Algérie 3.6% en Tunisie,4.4% au Maroc (Nafti et al. 2009). La prévalence mondiale, la morbidité et la mortalité liées à l'asthme infantiles chez les enfants ont considérablement augmenté au cours des 40 dernières années (Dharmage, Perret, et Custovic 2019).

1.1.2. La pathogénèse de l'asthme allergique

Les réponses a l'asthme allergique sont caractérisées par l'implication de cellule Th2 et d'immunoglobuline E (IgE) spécifique aux allergènes (Richards et Stumpf 2018). Les antigènes inhalés sont absorbés par les cellules dendritiques (CD) dans la lumière des voies respiratoires, après les CD activés migrent vers les ganglions lymphatiques thoracique régionaux (TLN), où se produit la présentation de l'antigène aux cellules T CD4+ naïves. Ces

CD activés par un antigène expriment des molécules costimulatrices et des cytokines qui fournissent des signaux clés pour la différenciation des cellules t CD4+ naïves en lymphocyte t helper de type 1(Th1), Th2,Th17,ou des cellules T régulatrice (Tregs).

La libération de cytokines, en particulier l'interleukine (IL)-4, IL-5 et IL-13 par les lymphocytes Th2 jouent un rôle fondamental dans la physiopathologie de l'asthme allergique, IL-4 conduit à la formation d'IgE par les cellules B et à médiation par les IgE induit l'activation de mastocytes, après interaction avec les IgE spécifique différents médiateurs tels que l'histamine, les protéases et des cytokines pro-inflammatoire sont produit par les mastocyte. La libération de ces médiateurs à des effets immédiats, comme bronchoconstriction et des effets à long terme, comme la prolifération des cellules musculaire lisses bronchique, IL-5 provoque l'agrégation des éosinophiles dans le site de l'inflammation et l'IL-13 est une cytokine multifonctionnel qui augmente l'hyperréactivité des voies respiratoires, hyper sécrétion de mucus, hyperplasie des cellules caliciformes et fibrose (Richards et Stumpf 2018).

Le remodelage, un terme utilisé pour décrire les changements persistants dans la structure des voies respiratoires, qui peut survenir et conduire finalement à une fibrose, une hypersécrétion du mucus, des dommages aux cellules épithéliales, une hypertrophie des muscles lisses et une angiogenèse.

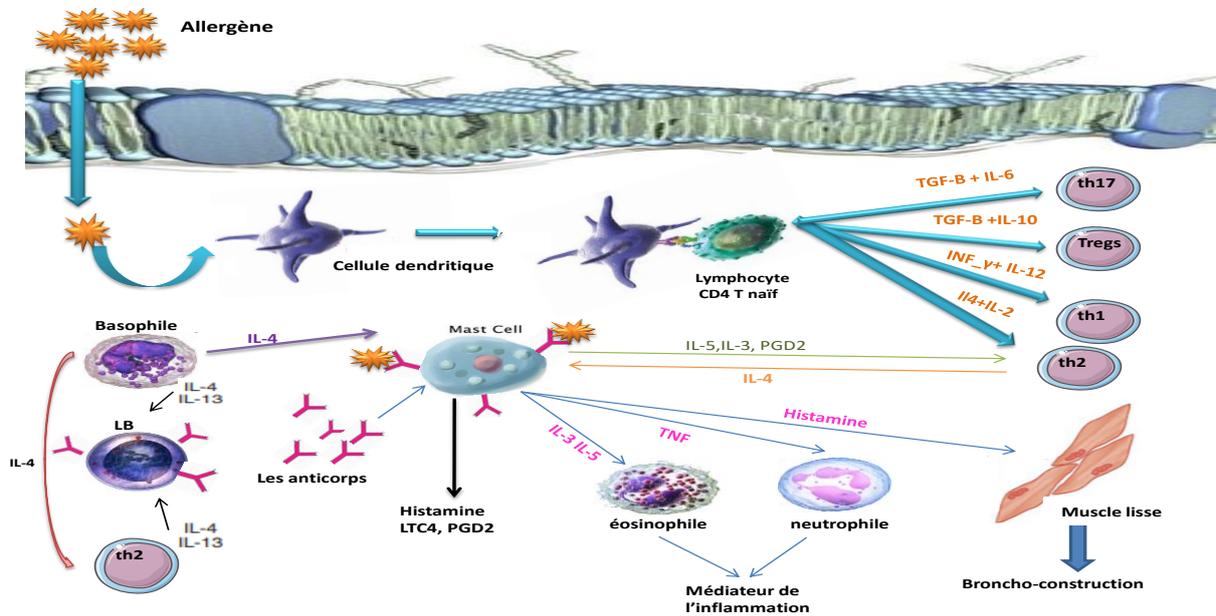


Figure 1.1. La réaction inflammatoire dans l'asthme allergique (Létuvé et Taillé 2013).

IL : interleukine ; TGF- : transformant facteur de croissance- β ; INF- : interféron ; PGD : prostaglandine D ; IG : immunoglobuline ; LTC4 : leucotriène C4 ; TNF: facteur de nécrose tumorale.

1.1.3. Histopathologie de l'asthme allergique pédiatrique

La première étude pionnière qui a étudié l'histopathologie bronchique chez les enfants asthmatiques a été par Cutz et al. En 1978, qui a décrit un infiltrat éosinophile important et un remodelage des voies respiratoire (Cutz 2002). Une évaluation dans (figure 1.2) sur les changements histopathologiques typiques de l'asthme chez les enfants d'âge préscolaire (Bonato et al. 2019). La détection précoce de l'éosinophile de voies respiratoires chez ces enfants était associée à des caractéristiques importantes de remodelage des voies respiratoires, non seulement une membrane basale (MB) épaissie, mais aussi une excrétion épithéliale et une néo-angiogenèse.

Ces études prouvent que l'inflammation et le remodelage sont présents au début de l'histoire naturelle de la maladie, remettant en cause la « théorie classique » de la pathogenèse de l'asthme considère le remodelage comme la conséquence d'une inflammation chronique de longue durée. En fait, les dommages chroniques de l'épithélium des voies respiratoire dû à une variété de stimuli pourraient activer des voies inflammatoires, libération de cytokines qui favorisant l'angiogenèse ainsi que l'épaississement de la membrane basale (MB) et du muscle lisse (Bonato et al. 2019).

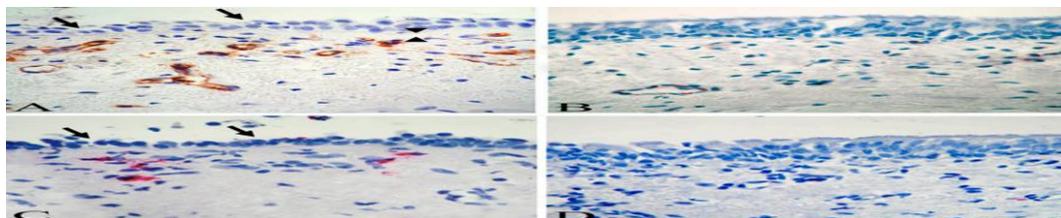


Figure 1.2. Les changements histopathologiques typiques de l'asthme chez les enfants (Bonato et al. 2019). 1. Coupes de biopsie d'un enfant asthmatique (A, C) et d'un enfant témoin (B, D). Un nombre accru de vaisseaux sous-épithéliaux (A, brun) et d'éosinophile (C, rouge) sont démontrés chez l'enfant asthmatique. Les flèches indiquent la perte de cellules épithéliales (A, C), tandis que les pointes de flèche indiquent un épaississement de la membrane baso-réticulaire (A). Immun-marquage avec un anticorps monoclonal anti-CD31 5 (A et B) et anti- E (Cet D). Grossissement d'origine fois 630.

1.1.4. L'étiologie de l'asthme allergique pédiatrique

L'étiologie de l'asthme allergique pédiatrique est variée, et semble être multifactorielle, car cette maladie vient de l'association des facteurs environnementaux et de prédisposition génétique proche de l'allergie qui favorisent sa survenu.

Chapitre 1. Revue de la littérature

Des facteurs de risque prénatal comprennent : (le tabagisme, la nutrition maternelle, le stress, l'utilisation d'antibiotiques et l'accouchement par césarienne) chez la femme enceinte augmente le risque de respiration sifflante et d'asthme chez l'enfant (Mastrorilli et al. 2016).

Tableau 1.1. Les facteurs impliqués dans l'expression de l'asthme allergique pédiatrique (Mastrorilli et al. 2016).

Des facteurs environnementaux	Sont essentiels à l'apparition de signes cliniques, surtout dans l'asthme allergique y compris : allergène d'acariens (HDM), moisissures, pollution de l'air, le froid modifie la respiration nasale et l'expiration par la bouche et cela résulte l'air qui pénètre dans les poumons sec et froid, et qui provoque un bronchospasme et une crise d'asthme.
Des facteurs génétiques	La prédisposition ou l'atopie est un facteur d'un risque de souffrir d'un asthme chez les enfants ayant un lien de parenté avec des personnes asthmatique. D'un autre côté, les enfants atteints de cette sensibilité génétique n'auront pas d'asthme si elles ne sont pas exposées à un environnement propice à l'asthme.
Des facteurs déclencheurs	1 - La fumée de tabac. 2 - Les produits chimiques irritants. 3 - Les infections respiratoires.

1.1.5. Le diagnostic de l'asthme allergique

Le diagnostic de l'asthme allergique repose sur les symptômes du patient, la démonstration d'IgE spécifiques aux aéroallergènes et une exposition significative aux aéroallergènes approprié (Eiringhaus et al. 2019). Un test d'allergie doit être administré chez les enfants souffrant d'asthme persistant, bien qu'il puisse être envisagé chez ceux qui souffrant d'asthme intermittent. Les tests de micro-réseau pour les IgE peuvent encore élucider les déclencheurs d'allergie.

Les tests IgE in vivo sont couramment utilisés pour les enfants et les adultes. Le plus souvent test in vivo utilisé pour inhaler, aliment, venin et les allergies médicamenteuses sont le test cutané (SPT). Le dernier est facile à réaliser, des petites quantités des extraits

d'allergène plus un positif (histamine) et le contrôle négatif sont appliquées de façon épicutanée avec une lancette sur l'avant-bras ou sur le dos. Après 15 à 20 min, une papule locale apparaît si le patient est sensibilisé à l'extrait (Önell et al. 2017).

D'autres tests d'allergie in vivo importants sont le test cutané intradermique pour les allergies au venin et les médicaments hypersensibilités, ainsi que des tests de provocation y compris le test de provocation nasale, utilisé pour la rhinite allergique, et le test de provocation bronchique, utilisés pour l'asthme (Williams et al. 2016), ces tests sont appliqués pour confirmer un diagnostic ou clarifier les écarts entre les tests de diagnostic et les symptômes cliniques. Pour la mesure in vitro des IgE aux extraits d'allergènes, plusieurs outils sont disponibles dans le commerce. Un bien établi et le système de test fréquemment utilisé est l'immuno CPA (Thermo Fisher Scientific). Les extraits de test contiennent un mélange de molécules allergènes et nom allergènes, par conséquent le IgE mesuré est une somme des anticorps contre chacun de ces composants (Önell et al. 2017).

Un résultat de test IgE positif ne doit pas être considéré comme un paramètre de diagnostic unique, mais doit être examiné en fonction des informations cliniques. En effet, un diagnostic peut restreindre la qualité de vie au moyen d'un traitement excessif et /ou évitement inutile de certains allergènes. Par conséquent, d'autres diagnostics d'allergie ne devraient être envisagés qu'après une enquête approfondie sur les antécédents cliniques et examen physique du patient qui indiquant une maladie allergique telle que l'asthme ou allergique, associée à une exposition à certaines allergènes.

1.1.5.1. Examen physique

Un diagnostic d'asthme doit être pris en considération lorsque l'un des symptômes suivants est présent : épisodes récurrents de toux, respiration sifflante ou oppression thoracique des symptômes qui surviennent la nuit ou perturbent le sommeil, des symptômes qui semblent être déclenchés par : (l'exposition aux animaux, de la poussière, des moisissures, de la fumée de tabac, des infections des voies respiratoires supérieures, de l'exercice, des changements météorologiques, du stress, d'une forte expression émotionnelle...). Le diagnostic chez les enfants âgés d'au moins cinq ans, se fait par le spiromètre et bronchodilatatrice (Vakili et al. 2020). Les enfants qui présentent une exacerbation aiguë sont diagnostiquées cliniquement et, il convient de commencer le traitement et d'envisager une radiographie pulmonaire dans la carte suivant : (premier épisode de respiration sifflante, résultats pulmonaires dans le carte suivant : (premier épisode de respiration sifflante, résultat pulmonaires asymétriques, fièvre inexplicée).

1.1.5.2. Les critères pour faire le diagnostic de l'asthme

Tableaux 1.2. Les caractéristiques utilisées pour établir le diagnostic de l'asthme selon GINA (globale initiative for Asthma) 2020

<p>1. Une histoire de symptômes respiratoires variables</p> <p>Les symptômes typiques sont une respiration sifflante, un essoufflement, une oppression thoracique, une toux.</p> <ul style="list-style-type: none">• Les symptômes surviennent de façon variable dans le temps et varient en intensité.• Les symptômes surviennent souvent ou s'aggravent la nuit ou au réveil.• Les symptômes sont souvent déclenchés par l'exercice, le rire, les allergènes ou l'air froid.• Les symptômes surviennent souvent ou s'aggravent avec les infections virales.
<p>2. Preuve d'une limitation variable du débit d'air expiratoire</p> <ul style="list-style-type: none">• Au moins une fois pendant le processus de diagnostic (par exemple lorsque le volume expiratoire forcé à 1 seconde (FEV1) est bas, documentez que le rapport FEV1 / capacité vitale forcée (FVC) est inférieur à la limite inférieure de la normale.• Documenter que la variation de la fonction pulmonaire est plus importante que chez les personnes en bonne santé. Par exemple, une variabilité excessive est enregistrée si : le VEMS chez les enfants, augmente par rapport à la ligne de base de > 12% de la valeur prédite) après l'inhalation d'un bronchodilatateur. • La variabilité journalière moyenne du PEF journalier est > 10% (chez l'enfant, > 13%). • Le VEMS (volume expiratoire maximal par seconde), augmente de plus de 12% et 200 ml par rapport à la valeur initiale (chez les enfants, de > 12% de la valeur prédite) après 4 semaines de traitement anti-inflammatoire (infections respiratoires extérieures). • plus il y a de variations excessives, plus vous pouvez être sûr du diagnostic d'asthme.• Une réversibilité bronchodilatatrice importante peut être absente lors d'exacerbations sévères ou d'infections virales. Si une réversibilité bronchodilatatrice importante n'est pas présente lors de son premier test, l'étape suivante dépend de l'urgence clinique et de la disponibilité d'autres tests. Pour d'autres tests pour aider au diagnostic, y compris les tests de provocation bronchique.

1.2. L'interleukine 10

L'interleukine 10, est une cytokine anti-inflammatoire, pareillement connue sous le nom d'agent bloqueur de la synthèse des cytokines humaines (CSIF). Chez l'homme, il est codée par le gène 10 est situé dans le chromosome 1 (Hyun et al. 2013), et ses signaux sont transmis par un complexe récepteur composé de deux protéines IL-10 récepteur-1 (IL-10R1) et protéine IL-10 récepteur-2 (IL-10R2).

L'activité immunosuppressive de l'IL10 dans la suppression de l'inflammation pulmonaire, est médiée par ses récepteurs. La ligature des récepteurs active la signalisation JAK / STAT, entraînant de grands changements dans le profil d'expression des gènes immunomodulateurs, en effet, servent à inhiber la synthèse des cytokines pro-inflammatoires tels que (interleukine1 (IL-1) ,facteur de nécrose tumorale TNF, interleukine 6 (IL-6)) (Schülke 2018).

La famille des cytokines de IL-10 comprend (IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26 interféron gamma 1, IFN- λ 2 et IFN- λ 3 (Ouyang et O'Garra 2019). Des études sur ces cytokines ont révélé leurs rôles fonctionnels profonds et indispensables dans l'infection, l'inflammation tissulaire, l'auto-immunité.

Tableau.1.3. Homologues cellulaires de l'IL-10 humaine (Zdanov 2004).

Cytokine	% d'identité avec il-10	Etat d'agrégation	Récepteur	Rôle biologique
IL-10	100%	Dimer	IL-10R1/IL-10R2	Immunosuppresseur, anti-inflammatoire
IL-19	21%	Monomère	IL-20R1/IL-20R2	Réponse immunitaire
IL-20	29%	Monomère	IL-20R1/IL-20R2 IL-22R1/IL-20R2	Différenciation cutanée
IL-22	26%	Monomère	IL-22R1/IL-10R2 IL-22BP	Réponse en phase aiguë dans les hépatocytes
IL-24	24%	Monomère	IL-20R1/IL-20R2 IL-22R1/IL-20R2	Inhibition de la croissance de différents types de tumeurs
IL-26	27%	Dimer	IL-20R1/IL-10R2	Réponse immunitaire
IFN- λ 1 IFN- λ 2 IFN- λ 3	Faible	Monomère	IFN- I1R1/IL-10R2	antiviral

1.2.1. Structure de l'interleukine 10

1.2.1.1. Structure de gène de l'interleukine 10

Le locus du gène de l'IL-10 humain est situé sur le chromosome 1 dans la position 11p32. Sa séquence déposée dans GenBank sous le numéro d'accèsion NC_000001, elle est constituée de 7 exons (Hyun et al. 2013).

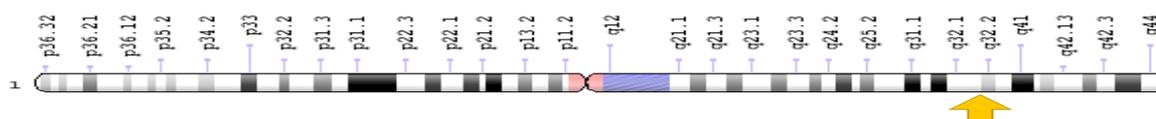


Figure.1.3. Localisation du gène IL-10 sur le chromosome 1

IL-10 s'est avéré être un gène candidat dans le mécanisme physiopathologique des maladies inflammatoires y a compris l'asthme allergique car il régule l'immunité cellulaire et humorale. La production d'IL-10 est stimulée par divers facteurs endogènes et exogènes, mais certaine variante alléliques du gène IL-10 sont également associées à des différences d'expression d'IL-10, il existe de nombreuses variantes génétiques du gène IL-10, cependant il à été démontré que trois polymorphismes mono-nucléotidiques SNP sont : rs1800896 - 1082 (G/A), rs180071-819(C/T), rs1800872-592 (C/ A) qui forment trois haplotypes prédominants (GCC,ACC,ATA) était associé à l'asthme pédiatrique (Huang et al. 2016). Cependant, il est nécessaire d'effectuer des études supplémentaires pour bien comprendre l'association des polymorphismes de l'IL-10 avec la prédisposition à la maladie de l'asthme allergiques et les processus pathologiques sous-jacents.

Tableau.1.4. Les polymorphismes SNP de l'IL-10 associé à l'asthme pédiatrique (Huang et al. 2016).

SNP	La substitution
L'allèle -1082 SNP	C'est une substitution G-à-A et se trouve dans un site de liaison de facteur de transcription putatif.
L'allèle -819 SNP	a un polymorphisme dimorphe, un Substitution de C à T.
L'allèle -592 SNP	C'est une substitution C-à-A et se trouve au sein d'une région.

1.2.1.2. Structure de la protéine de l'interleukine 10

La protéine codée par ce gène est homodimérique, nom covalente, de 37 KDa, former par deux monomères chacune forme un polypeptide de 160 acides aminés (aa) issu d'un précurseur de 178 aa constituant une séquence signal de 18 aa (Zdanov, Schalk-Hihi, et Wlodawer 1996). Le récepteur de l'IL-10 se compose de deux types de chaînes : IL-10R1 (récepteur a haute affinité) e IL-10R2 (récepteur a faible affinité). Chacune des deux chaînes à 3 domaines : extracellulaire de 200 aa, transmembranaire de 20 aa et domaine intracytoplasmique : 322 aa pour IL10R1 et 62 aa pour IL-10R2 (Pletnev et al. 2005).

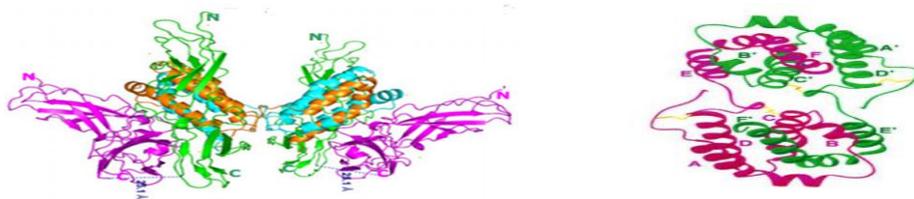


Figure .1. 4. Structure de l'interleukine 10 lié a son récepteur (Pletnev et al. 2005)

1.2.2. Source immunologique de l'interleukine 10

L'IL-10 a été initialement classée comme de type 2, du fait de sa production par les cellules de Th2 et de sa capacité à inhiber la production d'INF et IL-2 par les cellules Th1. (Branchett et al. 2020). Cependant il est désormais connu que l'IL-10 peut être également produite par défèrent population de leucocytes (Sabat et al. 2010, 10), y compris les sous – ensembles de cellules T CD4+, TH17, T régulateurs (T reg) , TCD8+, cellule NK, monocyte et cellule macrophage, cellule dendritique.

Un nombre croissant d'études ont montré que la différenciation insuffisante et les défauts fonctionnels des Tregs sont principales raisons de l'amélioration de la réponse Th2 et pathogénèse de l'asthme (Zhao et Wang 2018). Les cellules Treg qui produisent l'IL10 sont responsable a homéostasie du poumon, ces lymphocyte T, qui possèdent un fort pouvoir supresseur, sont caractérisés par une production élève de l'IL-10. Des études animales ont montré que l'IL-10 secrétés par les Tregs supprimaient nettement l'inflammation des voies respiratoires et la procréation assistée dans l'asthme, tandis que le blocage de l'IL-10 aggravait l'inflammation des voies aériennes (Zhao et Wang 2018).

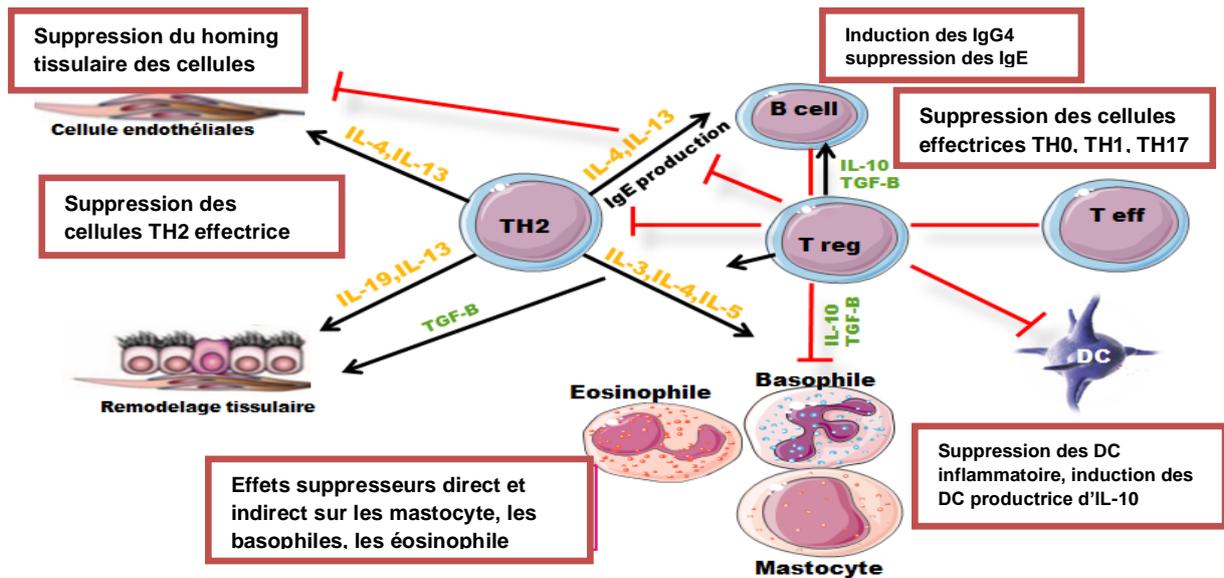


Figure.1.5. Rôle de lymphocyte T régulateurs dans le contrôle de l’asthme allergique (C. A. Akdis et Akdis 2011). Les cellules Treg contribuent au contrôle des réponses immunitaires spécifiques aux allergènes, plusieurs voies principales : suppression des CD qui soutiennent la génération de cellules T effectrices; suppression de TH2 et d'autres cellules effectrices; suppression des IgE spécifiques aux allergènes et induction des IgG4, IgA, ou les deux; suppression des mastocytes, des basophiles et des éosinophiles; interaction avec les cellules tissulaires résidentes et remodelage; et suppression de la migration des cellules T effectrices et d'autres cellules inflammatoires vers les tissus.

1.2.3. La signalisation de l’interleukine 10

La signalisation immuno-modulatrice de l’IL-10 joue un rôle important dans la pathologie de l’asthme allergique grâce à sa capacité à inhiber la synthèse de cytokine pro-inflammatoires non spécifique telles que (l’IL-1, l’IL-6, TNF α et l’INF- γ , ainsi que des cytokines associées à une inflammation allergique, y compris l’IL-4 et l’IL-5.

Dans les cellules présentatrice d’antigène (APC) la signalisation immuno-modulatrice est médiée par le récepteur hétérodimérique (IL-10R) contenant la sous-unité de liaison du ligand IL-10Ra et son partenaire IL-10Rb (Moore et al. 2001). L’activation de la kinase Janus1 (JAK1) et de la tyrosine kinase 2 (TyK2) ainsi que des voies du transducteur de signal et de l’activation de transcription 3 (STAT3) dans l’APC provoque la phosphorylation de STAT3 par IL-10R suivie de la translocation des homodimères STAT3 dans le noyau (Schülke 2018).

Les homodimères STAT3 dans le noyau se lient aux éléments de liaison à STAT et stimulent l'expression des gènes sensibles à STAT3 tels que le suppresseur de cytokine de la signalisation 3 (SOCS-3) et l'antagoniste des récepteurs IL-1 (IL-1RN) (figure 2.2). SOCS-3 inhibe efficacement l'activation de la protéine kinase (MAP kinase) activée par un mitogène, inhibe également la translocation de nuclear factor kappa B (NFκB) dans le noyau et l'induction de l'expression génique pro-inflammatoire, tandis que la protéine IL-1RN supprime la signalisation pro-inflammatoire initiée par la liaison de l'IL-1 β à son récepteur (Schülke 2018).

L'activation de STAT3 inhibe de plus l'activation de STAT6 et donc l'inhibition de l'expression des gènes sensibles à IL-4/ IL-13. (figure 2.2) grâce à ces événements, l'IL-10 inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNFα) et réduit à la fois l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité II et des molécules co-stimulantes (CD80, CD83, CD86) sur les APC (Schülke 2018).

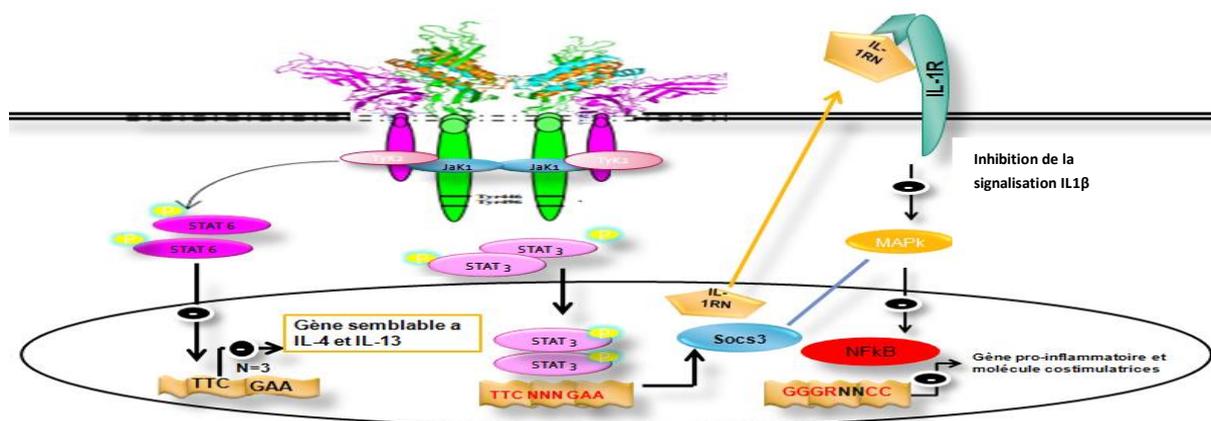


Figure 1.6. La signalisation immuno-modulatrice de l'interleukine 10 (Schülke 2018). Flèches noires: activation des voies de signalisation indiquées, flèches oranges: inhibition de la voie signalisation indiquée, flèches noires en pointillés: voies normalement induites par les molécules indiquées qui sont inhibées en présence de l'activation de STAT3.

1.2.4. Le profil anti-inflammatoire de l'interleukine 10 dans l'asthme allergique

Plusieurs études murins et humaines suggèrent que la fonction principale de l'IL-10 est anti-inflammatoire en ce qui concerne l'asthme allergique (Borish 1998). Son profil anti-inflammatoire représente un fort effet inhibiteur dans la régulation négative sur la production de cytokines pro-inflammatoires et ses potentiels de favoriser la résolution de l'inflammation pulmonaire.

En raison de l'importance du mastocyte associée à des mécanismes allergiques pulmonaires qui joue un rôle important dans la pathologie de l'asthme allergique. L'IL-10 a été initialement décrite comme facteur inhibiteur dans ces cellules (Speiran et al. 2009, 10), il inhibe la production de TNF α , IL-6 et GM-CSF dépendante des IgE, car la ligature du récepteur à haute affinité pour les IgE sur les mastocytes humains (MC) induit la libération de ces médiateurs pro-inflammatoires.

En plus de son effet inhibiteur sur l'expression de CMH II ou (HLA-DR) et différent molécules costimulatrices telles que CD54, CD80 et CD86 à la surface des cellules APC (Ogawa, Duru, et Ameredes 2008), il inhibe aussi la survie des éosinophiles dans la pathologie de l'asthme allergique, un mécanisme consiste à inhiber IL-5, une cytokine pro-inflammatoire qui induit l'inflammation des éosinophiles, par ses effets sur la survie et subsistance des éosinophiles (Marina Pretolani et Goldman 1997). IL-10 inhibe également les cellules T au repos produisant de l'IL-5, en interférant avec des signaux dépendants du B7-CD28 des ACP, qui peuvent favoriser la limitation du recrutement des éosinophiles représentant ainsi un autre mécanisme de suppression de l'éosinophile. Enfin, IL-10 aurait eu un effet direct sur les éosinophiles, en accélération de l'apoptose des éosinophiles (Ogawa, Duru, et Ameredes 2008).

1.2.5. L'interleukine 10 et l'asthme allergique pédiatrique

Une étude révélée que les enfants asthmatiques avait moins de cellule Tregs qui produit IL-10 dans les poumons que des enfants normaux (Hartl et al. 2007). Une réduction dans la production de l'IL-10 lors du contact avec l'antigène peut faciliter le développement de l'asthme allergique en biaisant les réponses immunitaires vers le développement des cellules TH2 et le développement de l'atopie et / ou de l'asthme infantile (Zhao et Wang 2018). Les cellules qui produisent l'IL-10 possèdent un fort pouvoir suppresseur, car l'IL-10 est connu pour inhiber la synthèse des cytokines pro-inflammatoires et inhibe aussi la survie des éosinophiles par multiple mécanisme dans l'asthme allergique. Cette expression de l'IL-10 peut aider à induire et à maintenir la tolérance aux allergènes. Cependant, l'absence de l'IL-10, ou au moins une diminution de leur nombre, pourrait contribuer à l'inflammation dans l'asthme allergique (Yang, Zhang, et Wu 2010).

Des études suggérées que les origines et mécanisme derrière ce manque d'induction de l'IL-10 dans les cellules des patients asthmatiques est lié à une carence en vitamine D chez les enfants asthmatique (Vasiliou et al. 2014). Cependant des niveaux sériques plus élevés de vitamine D sont associés à un nombre accru de cellule Treg circulantes qui

Chapitre 1. Revue de la littérature

pourraient stimuler la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires, y compris IL-10 qui entraînant une réduction significative des niveaux de nombreuses cytokines pro-inflammatoires impliquées dans la pathogenèse de l'asthme allergique pédiatrique (Hamzaoui et al. 2012) .

Tableaux.1.5. Les Fonctions biologiques de l'IL-10 compatibles avec son profile anti-inflammatoire (M. Pretolani 1999).

In vitro	Inhibition de la production d'IL-5 par les cellules T au repos, et régulation négative de l'expression de molécules costimulatrices sur CPA, inhibition de la synthèse et de la libération de GM-CSF par les cellules inflammatoires, inhibition de la stimulation dépendante des IgE des mastocytes, diminution de la survie des éosinophiles médiée par le LPS et le CD40.
In vivo (modèles animaux)	Suppression de l'éosinophilie induite par un antigène et de la libération d'IL-5 dans les poumons et la cavité péritonéale des souris immunisées.
In vivo (modèle humaine)	Diminution des taux de cytokines pro inflammatoire dans le plasma et inhibition de leur libération après systémique d'IL10.

1.2.6. Administration clinique de l'IL-10

L'IL-10 est induite et sécrétée en évidence par immunothérapie spécifique à l'allergène (SIT) (Till et al. 2004), le SIT est efficace, en grande partie, car il induit des Tregs et des cellules dendritiques qui produisent IL-10 (M. Akdis et Akdis 2007) .IL-10 génère non seulement la tolérance dans les cellules T mais inhibe également la production des IgE spécifique de l'antigène (Jutel et al. 2003). Le SIT est indiqué pour les patients avec IgE telles que la rhinite allergique, due à la sensibilité aux allergènes connus, y compris le pollen, les moisissures, les animaux. L'administration SIT est sous-cutanée et se poursuit pendant 3 à 5

ans. De plus, dans les populations pédiatriques, le SIT a démontré des effets protecteurs dès le début de l'asthme, ainsi que l'inhibition de la progression allergique et de nouvelles sensibilisations (Möller et al. 2002), donc ces résultats offrent un potentiel théorique de développement de futurs traitements de type SIT spécifiques aux poumons pour les maladies de l'inflammation des voies aériennes y compris l'asthme allergique.

1.3. La PCR (Polymérase Chaîne Réaction)

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) inventée par le biochimiste américain Kary Mullis en 1983 (Mullis 1990), c'est une méthode enzymatique largement utilisée pour l'amplification des fragments ADN spécifique in vitro qui peut produire rapidement des millions à des milliards d'exemplaires d'échantillons d'ADN spécifiques, permettant aux scientifiques d'extraire de très petits échantillons d'ADN et de les agrandir assez pour mener des études détaillées. En raison des produits d'amplification le cycle précédent est utilisé comme modèle pour le cycle suivant, et l'amplification est un processus index et technologie de détection d'acide nucléique très sensible.

1.3.1. Le principe de la PCR

La technique de la PCR se fonde sur trois étapes essentielles. Etape 01 : Percevoir les fragments (20 nucléotides) qui se ressemblent à la séquence d'ADN à amplifier. Etape 02 : est La synthèse des amorces oligonucléotidiques, se sont des séquences complémentaires à ces fragments. Etapes 03 : La synthèse des brins complémentaires par l'ADN polymérase grâce aux amorces et pour chaque réplication le nombre de copie de l'ADN est doublée (Mathys et al. 2007).

1.3.2. Les acteurs de la PCR

L'ADN, En général sous forme de double-brin, contient le fragment à amplifier. L'enzyme Taq Polymerase une ADN polymérase thermorésistante c'est une extraite d'une bactérie *Thermus aquaticus*. La température d'action est de 72°C et elle résiste à des passages successifs à 95°C, ce qui a rendu possible l'automatisation de la procédure. Les nucléotides dGTP, dATP, dTTP, dCTP qui sont les éléments de base utilisés par la Taq Pol pour synthétiser les brins d'ADN complémentaires.

1.3.3. Les étapes de la PCR

La première étape et la dénaturation: le chauffage à la première étape de 95 ° C peut séparer les deux brins d'ADN, homogénéiser le milieu réactionnel et inhiber d'autres enzymes qui peuvent être présentes dans la solution. Puis l'hybridation d'amorce (56-64 ° C): les amorces sont spécifiquement appariées avec leurs brins Complémentaire à l'ADN dénaturé. L'étape suivante est l'extension de l'amorce par l'intervention de la polymérase taq (ADN polymérase) qui prolonge les amorces en incorporant de l'ADN complémentaire de la séquence matricielle à laquelle elle s'hybride. Cette étape est réalisée à une température de 72 ° C.

Une nouvelle étape dans le prochain cycle de la dénaturation sépare les brins d'ADN matrice des brins néo synthétisés, qui deviennent à leur tour la matrice pour la prochaine réaction. La répétition d'un cycle de changements de température d'environ 25 à 35 fois permet d'amplifier la quantité totale d'ADN concerné à la séquence cible presque exponentiellement (Uhel, Zafrani, et Commission de la recherche translationnelle de la Société de réanimation de langue française 2019).

1.3.5. Les amorces

Les oligonucléotidiques d'ADN monocaténaire sont de courtes séquences, lors des Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sont utilisées pour amplicon. Il faut qu'elles soient spécifiques de la séquence à amplifier, compatibles et stable entre elles.

1.3.6. Conception des amorces pour la PCR

La conception des amorces est considérée comme le paramètre le plus important pour la réussite de la PCR, d'un autre côté une amorce mal conçue peu bloquer le fonctionnement de la réaction PCR. La séquence d'amorce définit beaucoup de choses, telle que la longueur et la position du produit, sa température de fusion et le rendement (Jane Gurr 1991). L'osque une amorce est mal conçue elle peut conduire à une faible production, voire nulle, à cause d'une amplification non spécifique et / ou à la production de dimères d'amorce, qui peuvent devenir suffisamment compétitif pour diminuer la formation du produit (Deitcher 1995).

1.3.6.1. Les Choix des amorces de PCR

La spécificité cet aspect est essentiel, surtout si on s'intéresse à un transcrite alternatif précis, ou une Famille multigénique, les amorces doivent être choisis de sorte qu'ils aient

une séquence unique dans le ADN matrice qui doit être amplifié. Un apprêt conçu avec une séquence hautement répétitive entraînera un frottis lors de l'amplification de l'ADN génomique.

Pour la Recherche de bonnes amorces, il faut bien sélectionner l'amorce pour une efficacité optimale de la PCR, différents facteurs interviennent pour obtenir une bonne amorce y compris : La taille optimale est entre 18 à 22 bases, généralement les oligonucléotides qui sont entre 18-24 bases sont énormément spécifiques de la séquence mais la température d'hybridation doit être optimale. La longueur de l'amorce est aussi relative à l'efficacité de l'hybridation. Cependant, l'hybridation est moins efficace lorsque l'amorce est plus longue.

La température de fusion : entre 52°C et 58°C, car un T_m trop élevé accroît le risque de mauvais appariement, cependant un T_m trop faible dévoile que l'appariement double-brin de l'amorce sera pas très stable et provoquera de moins bon résultat. Les pourcentages de G et C dans l'appariement doivent être d'au moins 40% à 60%, La séquence de l'amorce doit être sélectionnée de manière à ce qu'aucune suite poly-G ou poly-C ne puisse favoriser l'hybridation non spécifique. Les suites polyA et poly-T doivent aussi être évitées, parce qu'ils (respirent) et ouvrent des parties du complexe amorce-matrice, ce qui peut réduire l'efficacité d'amplification.

1.3.6.2. Les séquences d'amorces complémentaires

Les amorces doivent être conçues sans aucune homologie intra-amorce au-delà de 3 paires de base. Si une amorce a une telle région d'auto-homologie, un (retour en arrière) peut se produire. Un autre danger connexe est l'homologie inter-amorce : homologie partielle au milieu des régions de deux amorces peuvent interférer avec l'hybridation. Si l'homologie doit se produire à l'extrémité 3' de chaque amorce, une formation de dimère d'amorce se produira.

1.3.6.3. La séquence à l'extrémité 3'

Il est bien établi que la position 3' terminale dans les amorces de PCR est importante pour le contrôle des erreurs d'amorçages. Les amorces doivent être « plus collantes » à leurs extrémités 5' qu'à leurs extrémités 3'. Une 3' « collante » comme indiqué par un contenu G/C élevé pourrait réduire potentiellement à nombreux sites sur l'ADN matrice. Un "G" ou "C" est souhaitable à l'extrémité 3' mais la première partie de cette règle devrait s'appliquer.

1.4. Problématique

L'asthme allergique est fortement corrélé à l'inflammation des voies respiratoires causée par des cytokines pro-inflammatoires et IL-10 s'est révélé exercer des activités anti-inflammatoires qui inhibe la synthèse de ses cytokines pro-inflammatoires au cours de la pathologie de l'asthme allergique, en raison de ses activités largement anti-inflammatoires des études approfondies sur l'expression de l'IL-10 sont nécessaires. Cependant l'étude de l'expression du gène de l'IL10 au cours de l'asthme allergique, consiste une PCR réussite et la conception des amorces est considérée comme le paramètre le plus important pour le succès de la PCR., il faut un bon choix des amorces pour le bon déroulement de la PCR. Dans cette optique nous avons conçu des amorces du gène de l'IL-10 pour l'étude de profil anti-inflammatoire au cours de l'asthme allergique pédiatrique.

Objectif

Notre objectif est de concevoir des amorces du gène qui code pour l'IL-10 pour l'étude de profil anti-inflammatoire au cours de l'asthme allergique.

But

Notre étude a pour but de choisir un bon couple d'amorce spécifiques qui encadrent le gène de IL10 afin de réaliser par la suite une PCR pour évaluer et détecter l'expression du gène de l'IL-10 au cours de l'asthme allergique pédiatrique.

Chapitre 2. Matériels et méthodes

1. La séquence du gène de l'interleukine 10

Le locus du gène de l'IL-10 humaine est situé sur le chromosome 1 dans la position 1q32, constituée de 7 exons. La séquence du gène IL-10 a été importé de la base de données ensembl (www.ensembl.org) après avoir spécifié l'espèce humaine et mettre le nom du gène.

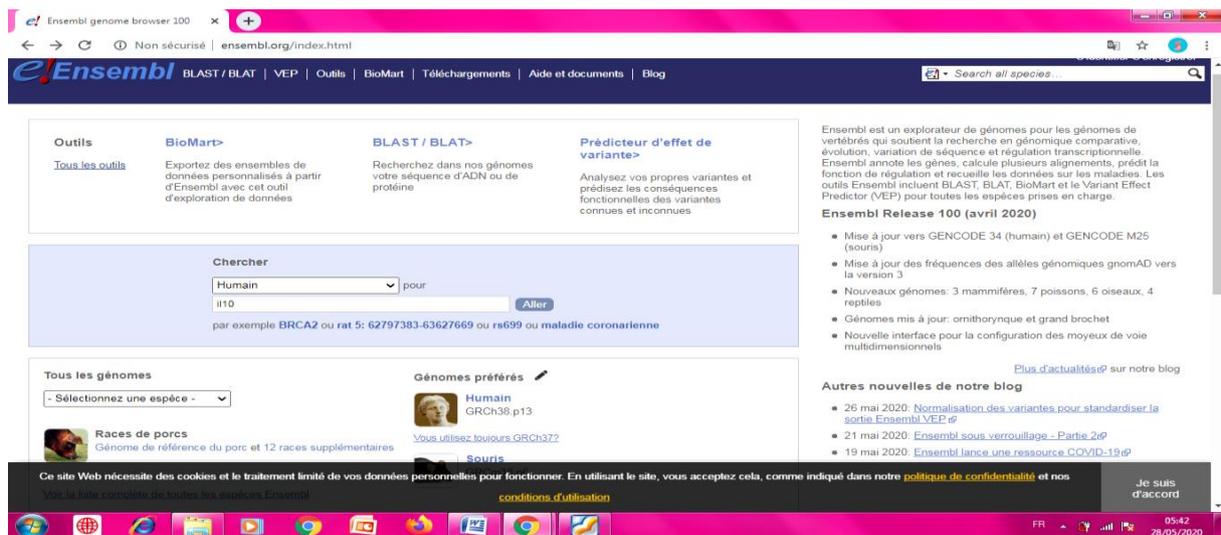


Figure 2.1. Plateforme de la base de données Ensembl.

La séquence complète du gène de l'IL-10 peut être trouvée sous le code ENSG00000136634 comme montré dans les figures suivantes :

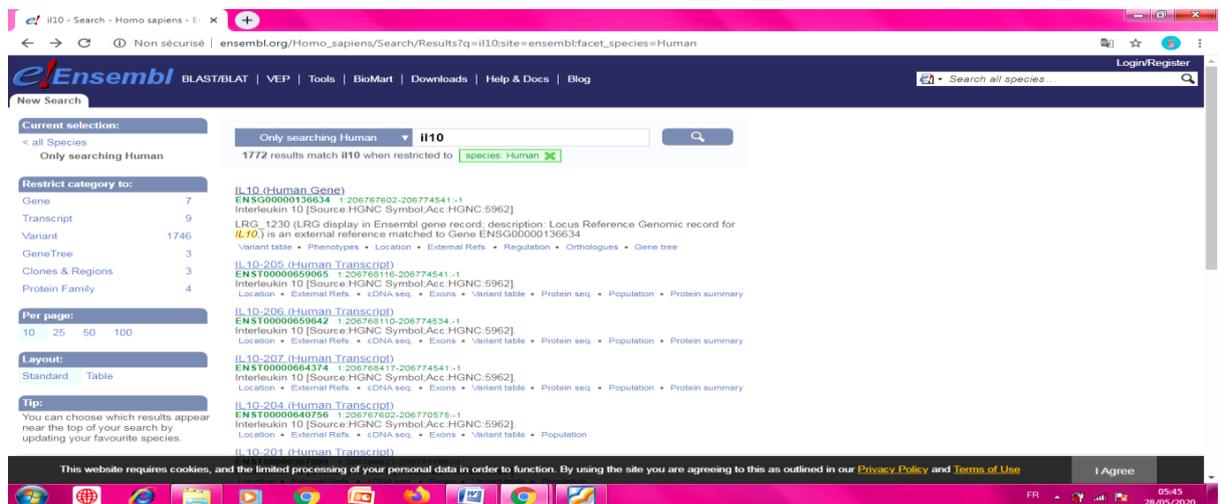
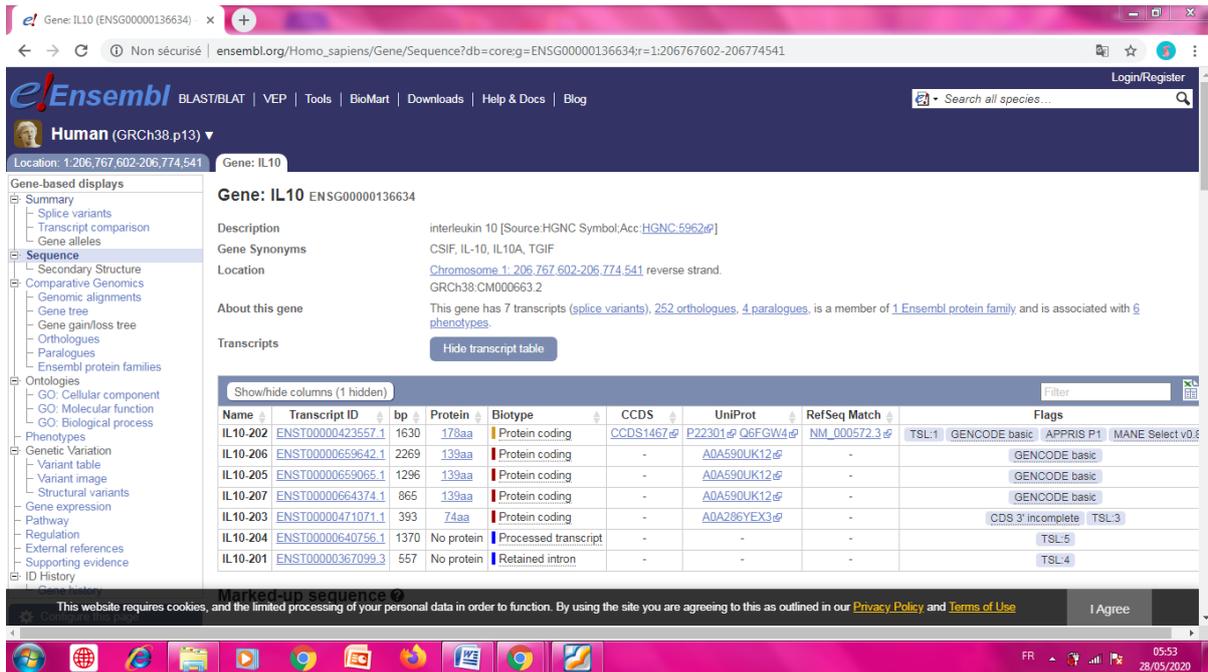


Figure 2.2. Introduction du gène de l'IL-10 dans la base de données Ensembl.

Chapitre 2. Matériels et méthodes



Gene: IL10 (ENSG00000136634)

Description: interleukin 10 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5962]

Gene Synonyms: CSIF, IL-10, IL10A, TGIF

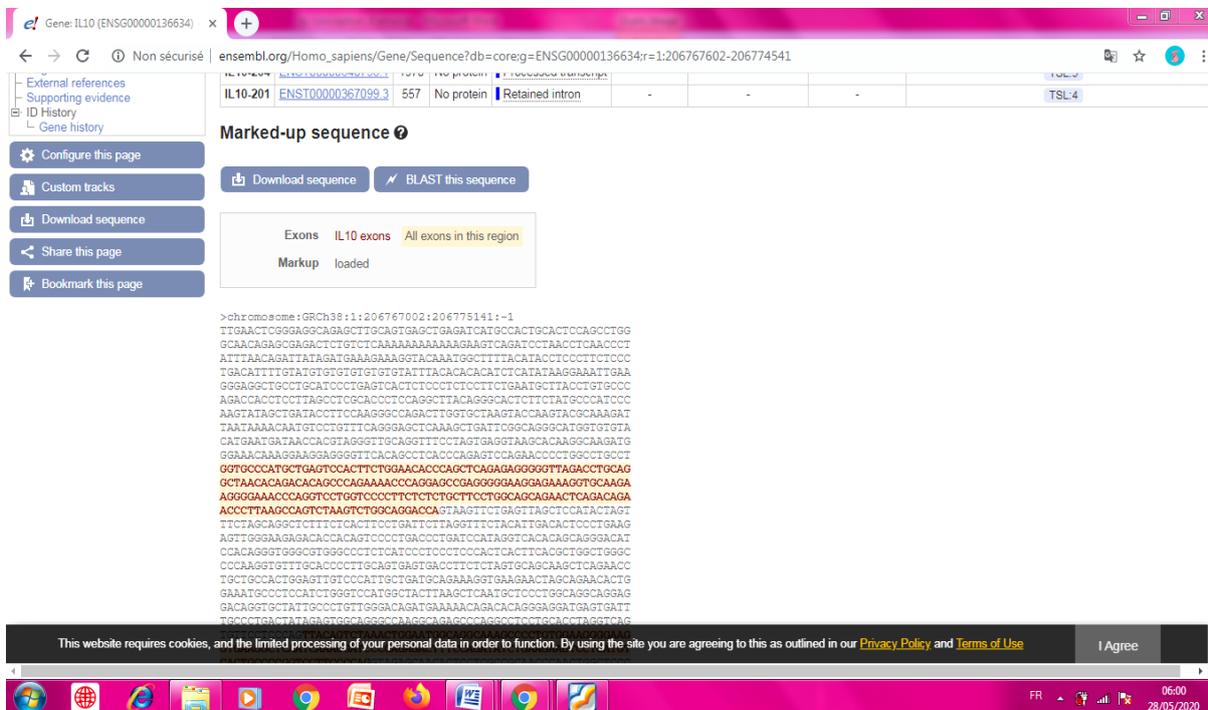
Location: Chromosome 1: 206,767,602-206,774,541 reverse strand. GRCh38:CM000663.2

About this gene: This gene has 7 transcripts (splice variants), 252 orthologues, 4 paralogues, is a member of 1 Ensembl protein family, and is associated with 6 phenotypes.

Name	Transcript ID	bp	Protein	Biotype	CCDS	UniProt	RefSeq Match	Flags
IL10-202	ENST00000423557.1	1630	178aa	Protein coding	CCDS1467.0	P22301 Q5FGW4	NM_00572.3	TSL:1 GENCODE basic APPRIS P1 MANE Select v0.8
IL10-206	ENST00000659642.1	2269	139aa	Protein coding	-	A0A590UK12	-	GENCODE basic
IL10-205	ENST00000659065.1	1296	139aa	Protein coding	-	A0A590UK12	-	GENCODE basic
IL10-207	ENST00000664374.1	865	139aa	Protein coding	-	A0A590UK12	-	GENCODE basic
IL10-203	ENST00000471071.1	393	74aa	Protein coding	-	A0A286YEX3	-	CDS 3' incomplete TSL:3
IL10-204	ENST00000640756.1	1370	No protein	Processed transcript	-	-	-	TSL:5
IL10-201	ENST00000367099.3	557	No protein	Retained intron	-	-	-	TSL:4

Figure 2.3. Code donnée pour le gène de l'IL-10.

La figure 2.4 montre la séquence du gène de l'IL-10 sur la plateforme Ensembl, la séquence est divisée en séquences non codantes (en noir), et séquences codantes (en rouge).



Marked-up sequence

Download sequence BLAST this sequence

Exons IL10 exons All exons in this region

Markup loaded

```
>chr01:GRCh38:1:206767002:206775141:-1
TTGAACCTCGGGAGCAGAGCTTGCAGTGAAGTATGATCATGCCACTGCCTCCAGCCTGG
GCACACAGAGGAGACTCTGTCTCAAAAAGAGAGAGAGTCAAGATCCTTAACTCAACCT
ATTTACAGATTATAGTGAAGAGAGAGTACAAATGCTTTTACACTCCTCCCTTCTCC
TGCATTTTGTATGTGTGTGTGTGTATTTACACACATCTCATATAGAAATTGAA
GGAGGCTTCCCTGCATCCCTGAGTCACTCTCCCTCTCCTCTGATAGTCTTCTGCCC
AGACCCTCTTACCTGCACCTCCAGGCTTACAGGCTTCTTATGCCATCCC
AAGTATAGCTGATACCTTCCAGGSCCAGACTTGTGTAAAGTACCAAGTACGAAAGAT
TAATAAACAATGTCTCTTTCAGGAGCTCAAAGCTGATTCGGCAGGSCATGTTGTGA
CATGATGATAACCACTAGGTTTGCAGTTTCTAGTGAAGTAAACACAGGCAAGATG
GGAAACAAAGAGAGAGAGGTTTCAACAGCTCACAGAGTCCAGACCTTGGCTTGGCT
GGTCCCATGCTGAGTCCACTTCCAGACACCCAGAGCGGAGGGGAGAGAGAGTGCAG
GCTAACACAGACACACCCAGAAAACCCAGAGCGGAGGGAGAGAGAGTGCAGAG
AGGGAAACCCAGGCTCTGCTCCCTTCTCTCTGCTTCCCTGCAGAGAACTCAGACAGA
ACCCCTAAGCCAGTCTAAGTCTGGCAGGACCACTAAGTTCTGAGTGTAGCTCCTACTAGT
TTCTAGCAGGCTCTTCTCACTTCTGATCTTAGTTTCTAGATGACACTCCCTGAG
AGTTGGAGAGACACACACTCCCTGACCTGATCCATAGTCCACACAGCAGGACAT
CCACAGGTTGGGCTTGGCCCTCTCATCCCTCCCTCCACTCACTTCAAGCTGGCTGGCC
CCCAAGGTTTGCACCCCTTGCATGAGTGAACCTTCTTATGACACAGCTCAGACCC
TCTTCCACTCCAGGTTCTCCCTTCTGATCCAGAGGTTGAGATCAGCAGACTG
GAATGCCCTCCACTTGGTCCATGCTTAACTCAATCTCCCTTGCAGGAGGAG
GACAGGCTATTGCCCTTGGGACAGATGAAAACACACAGCAGGAGGATGAGTGT
TCCCTGACTTGTAGTGGAGGCTCAGCAGAGGCTTCTGCTTCTGAGTGTAGT
```

Figure 2.4. la séquence du gène de l'IL-10 sur plateforme Ensembl.

Chapitre 2. Matériels et méthodes

Ensuite la séquence du gène de l'IL-10 est copiée dans un document Word pour faciliter son utilisation.

```
AAGTATAGCTGATACCTCCAAGGGCCAGACTTGGTGCTAAGTACCAAGTACGCAAAGAT
TAATAAAACAATGTCTGTTTCAGGGAGCTCAAAGCTGATTCGGCAGGGCATGGTGTGTA
CATGAATGATAACCACGTAGGGTTGCAGGTTTCTAGTGAGGTAAGCACAAAGGCAAGATG
GGAAACAAAGGAAGGAGGGGTTACAGCCTCACCCAGAGTCCAGAACCCCTGGCCTGCCT
GGTGCCCATGCTGAGTCCACTTCTGGAACACCCAGCTCAGAGAGGGGGTTAGACCTGCAG
GCTAACACAGACACAGCCCAGAAAACCCAGGAGCCGAGGGGGAAGGAGAAAGGTGCAAGA
AGGGGAAACCCAGGTCTGGTCCCCTTCTCTGCTTCTGCGCAGCAGAACTCAGACAGA
ACCCCTAAGCCAGTCTAAGTCTGGCAGGACCAAGTAAGTTCTGAGTTAGCTCCATACTAGT
TTCTAGCAGGCTCTTTCTCACTTCTGATTCTTAGGTTTCTACATTGACACTCCCTGAAG
AGTTGGGAAGAGACACCACAGTCCCCTGACCCTGATCCATAGGTCACACAGCAGGGACAT
CCACAGGGTGGGCGTGGGCCCTCTCATCCCTCCCTCCCACTCACTTACGCTGGCTGGC
```

Figure 2.5. Exemple 01 de la séquence du gène de l'IL-10.

2. L'outil de Primer –Blast

Cet outil est retrouvé dans la base de données (www.ncbi.nlm.nih.gov), National center for Biotechnology Information (ncbi), qui nous permet une conception d'amorces les plus spécifiques de la séquence que l'on veut amplifier. Les étapes de l'utilisation de cet outil sont représentées dans les figures suivantes :

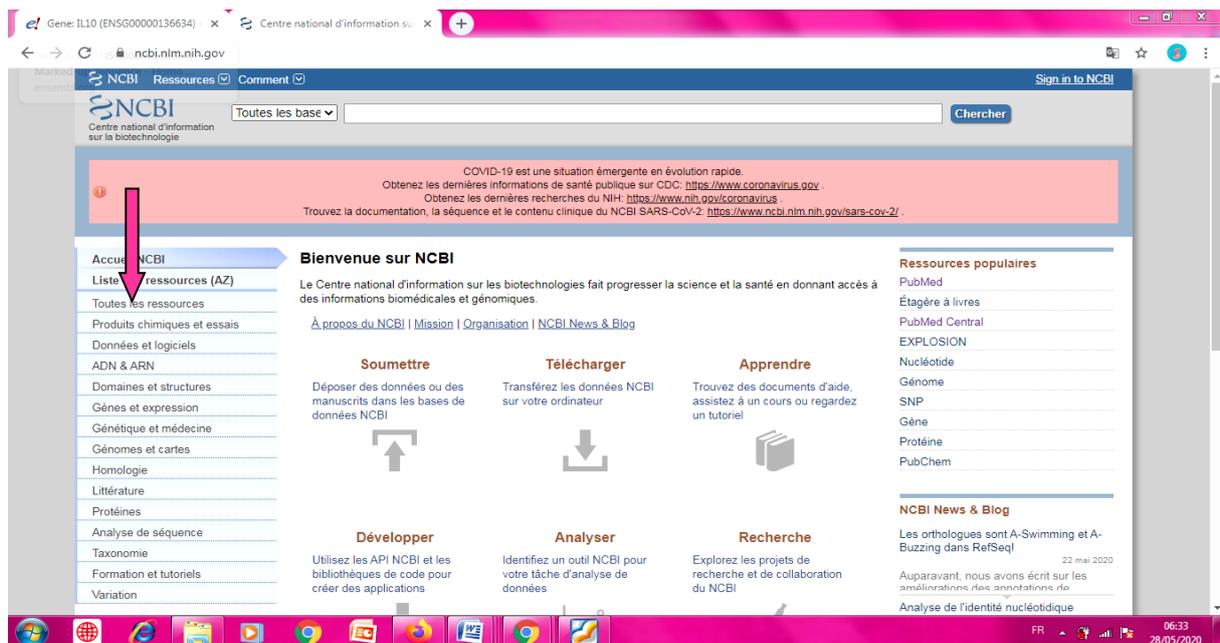


Figure 2.6. Plateforme de base de données ncbi

Chapitre 2. Matériels et méthodes

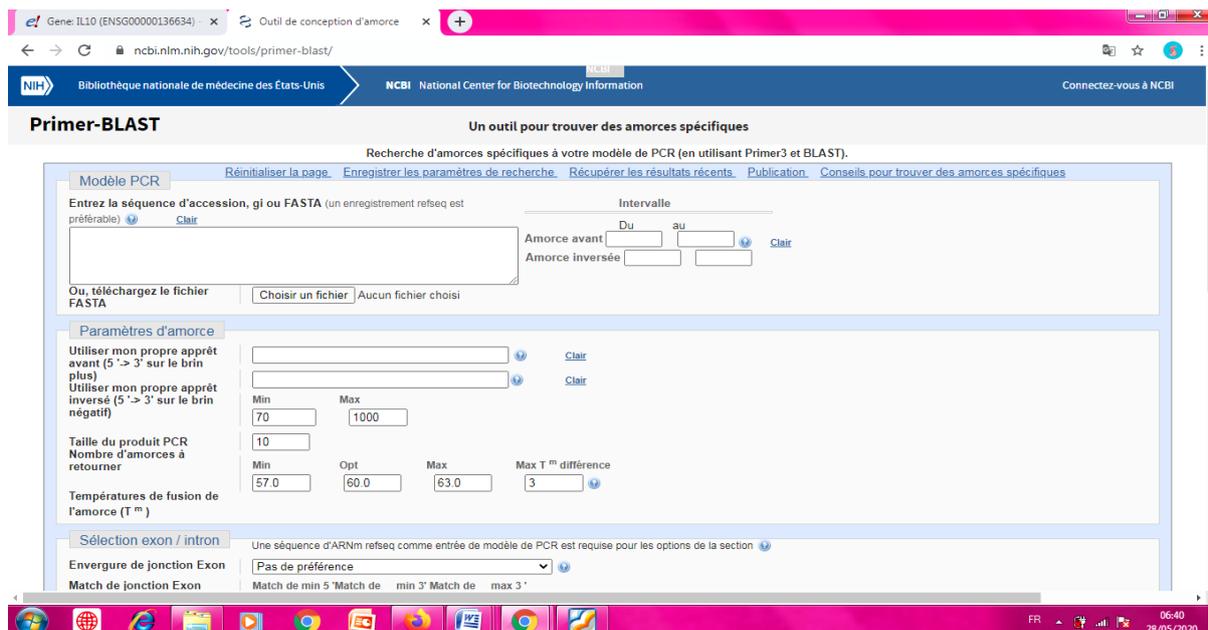


Figure 2.7. Interface du logiciel Primer Blast

3. Analyse des résultats du primer Blast

Les couples d'amorces choisi doit répondre aux critères suivant :

- Ignorer les produits aspécifiques de plus de 1000 Pb, car lors d'une PCR il est moins probable d'amplifier une séquence de plus de 1Kb
- Il faut choisir le couple d'amorce qui donne le moins de produits aspécifiques, afin d'amplifier que le produit étudié.
- Le pourcentage de la teneur en GC doit être comprise entre 40 et 60%.
- Les températures d'hybridation des deux amorces doivent être les plus proche possibles, car la température d'hybridation lors d'une PCR est programmée en une seule température.

Chapitre 3. Résultats

1. Résultats de la conception des amorces

Tout d'abord, les dix paires d'amorce données par l'outil Primer blast n'amplifierais pas seulement la région promotrice du gène de l'IL10. Cependant plus d'un produit aspécifique de moins de 900 paires de base (Pb) ont été amplifié par chaque pair d'amorce, alors ce résultat n'est pas pris en compte.

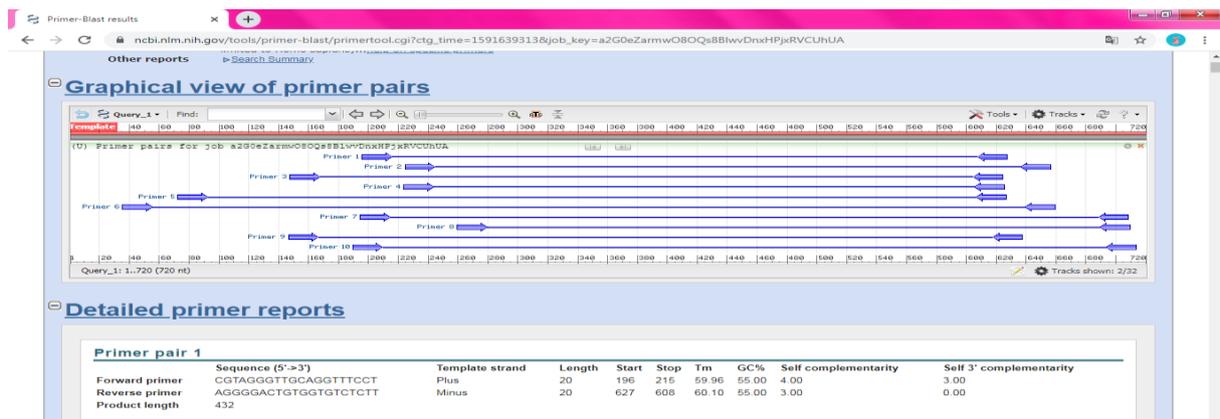


Figure 3.1 Représentation graphique des 10 paires d'amorces encadrent une partie du gène de l'IL-10

Nous avons ensuite agrandir la séquence à amplifier, afin de donner au logiciel un plus large choix de séquence pour les amorces. Avec l'aide du logiciel Primer Blast nous avons obtenus un couple d'amorce spécifique encadrant une partie du gène de l'IL-10.

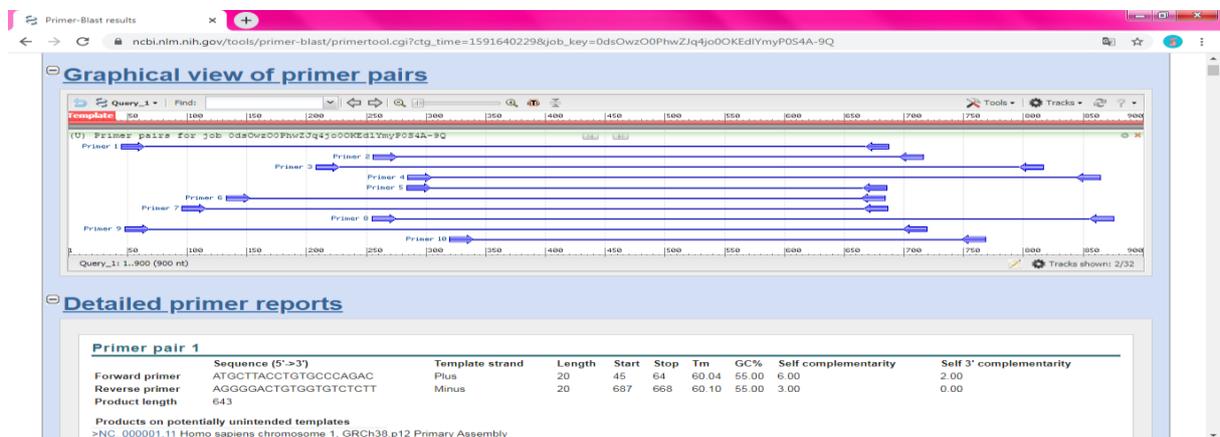


Figure 3.2. Représentation graphique des 10 nouvelles paires d'amorces encadrent une partie du gène de l'IL-10

Chapitre 3. Résultats

Parmi les dix nouveaux couples d'amorces nous avons choisis la troisième paire, elle amplifiera un fragment de 609 Pb correspondant au gène de l'IL-10 et un produit aspécifiques de 3806 Pb (figure 3.3).

The screenshot displays the results of a Primer-Blast search. The selected primer pair is labeled 'Primer pair 3'. The table below summarizes its characteristics:

	Sequence (5'>3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCTCAAAGCTGATTCCGGCAG	Plus	20	208	227	59.90	55.00	5.00	2.00
Reverse primer	AAGGTCACCTACTGCAAGGG	Minus	20	816	797	59.89	55.00	4.00	2.00
Product length	609								

Below the table, the results for 'Products on potentially unintended templates' are shown. The first product is from NC_000001.11 (Homo sapiens chromosome 1, GRCh38.p12 Primary Assembly) with a product length of 609. The second product is from NC_000003.12 (Homo sapiens chromosome 3, GRCh38.p12 Primary Assembly) with a product length of 3806. The third product is from NC_000002.12 (Homo sapiens chromosome 2, GRCh38.p12 Primary Assembly) with a product length of 2304. The fourth product is from NC_000015.10 (Homo sapiens chromosome 15, GRCh38.p12 Primary Assembly) with a product length of 3724. Each product entry includes flanking features and primer coordinates.

Figure 3.3. Résultat du Primer blast montrant les caractéristiques de la paire d'amorces choisis.

Cette paire d'amorce a été choisi car elle donne le moins de produits aspécifiques et les températures d'hybridation des deux amorces sont très proches de : 59.90°C et 59.89°C,

Chapitre 3. Résultats

les longueurs des amorces sont 20 nucléotides (figure 2.11), les oligonucléotides entre 18 et 24 base sont fortement spécifique de la séquence. La teneur en GC est de 55% (figure 2.11) et la teneur en GC d'une amorce doit être comprise entre 40 et 60%. Ce qui renforce notre choix pour cette troisième paire.

Primer pair 3									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCTCAAAGCTGATTCGGCAG	Plus	20	208	227	59.90	55.00	5.00	2.00
Reverse primer	AAGGTCACACTCACTGCAAGGG	Minus	20	816	797	59.89	55.00	4.00	2.00
Product length	609								

Figure 3.4. Les caractéristiques du couple d'amorce choisi

Ensuite, nous avons situé notre paire d'amorce dans la séquence du gène de l'IL-10 montré dans la figure 2.12.

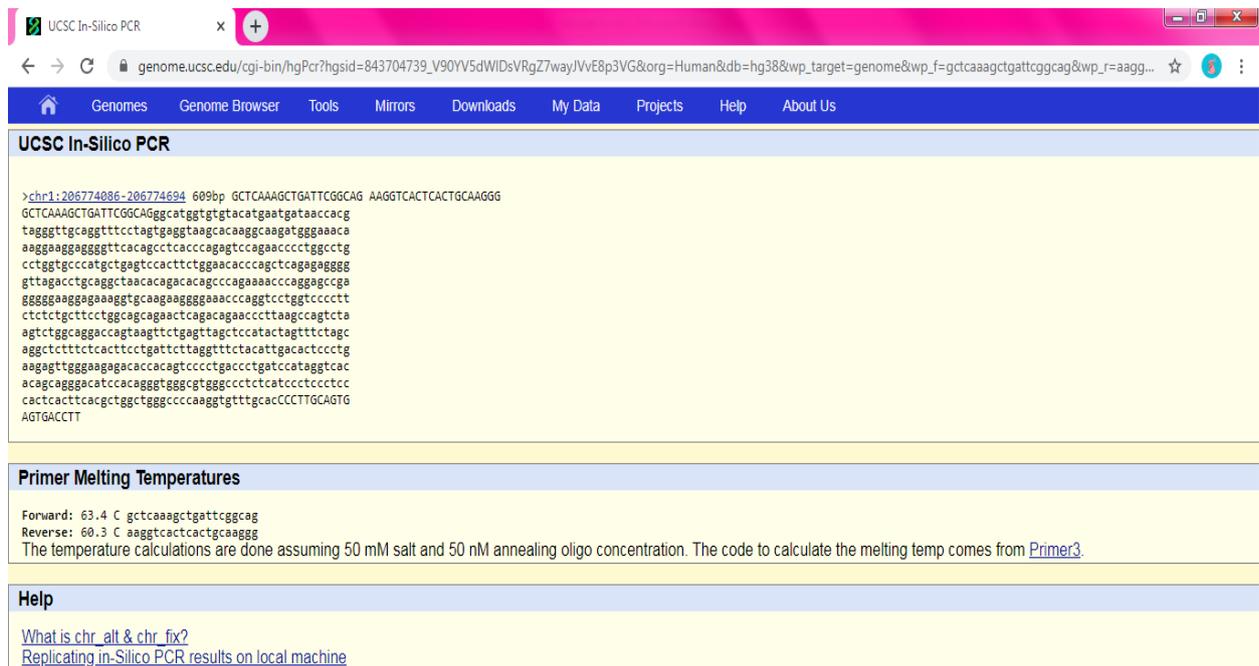
```

AGACCACCTCCTTAGCCTCGCACCTCCAGGCTTACAGGGCACTCTTCTATGCCCATCCC
AAGTATAGCTGATACCTTCCAAGGGCCAGACTTGGTGCTAAGTACCAAGTACGCAAAGAT
TAATAAAACAATGTCCTGTTTCAGGGAGCTCAAAGCTGATTCGGCAGGGCATGGTGTGTA
CATGAATGATAACCACGTAGGGTTGCAGGTTTCTAGTGAGGTAAGCACAAAGGCAAGATG
GGAAACAAAGGAAGGAGGGGTTACAGCCTCACCCAGAGTCCAGAACCCTGGCCTGCCT
GGTGCCCATGCTGAGTCCACTTCTGGAACACCCAGCTCAGAGAGGGGGTTAGACCTGCAG
GCTAACACAGACACAGCCCAGAAAACCCAGGAGCCGAGGGGAAGGAGAAAGGTGCAAGA
AGGGGAAACCCAGGTCCTGGTCCCCTTCTCTCTGCTTCTGGCAGCAGAACTCAGACAGA
ACCTTAAGCCAGTCTAAGTCTGGCAGGACCA GTAAGTTCTGAGTTAGCTCCATACTAGT
TTCTAGCAGGCTCTTTCTCACTTCTGATTCTTAGGTTTCTACATTGACACTCCCTGAAG
AGTTGGGAAGAGACACCACAGTCCCCTGACCCTGATCCATAGGTCACACAGCAGGGACAT
CCACAGGGTGGGCGTGGGCCCTCTCATCCCTCCCTCCCACTCACTTCACGCTGGCTGGGC
CCCAGGTGTTTGACCCCTTGCAAGTGAAGTACCTTCTCTAGTGCAGCAAGCTCAGAACC
  
```

Figure 3.5. Paire d'amorce N° 3 (en vert) encadrent une partie de la séquence du gène de l'IL-10.

2. Confirmation des résultats

Nous avons soumis la séquence d'amorces à l'analyse de confirmation effectuée par le programme sur le site ([http /génom UCSC.edu /](http://genome.ucsc.edu/)). Les résultats de cette confirmation ont donné un produit de 609 Pb situé sur le chromosome 1 (figure 2.14), ce qui correspond à la localisation du gène de l'IL-10. Ces résultats confirment donc la spécificité et la fiabilité des amorces que nous avons conçues.



The screenshot displays the UCSC In-Silico PCR tool interface. The browser address bar shows the URL: genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?hgsid=843704739_V90YV5dWIDsVRgZ7wayJVvE8p3VG&org=Human&db=hg38&wp_target=genome&wp_f=gctcaagctgattcggcag&wp_r=aagg...

The main content area is titled "UCSC In-Silico PCR" and displays the following sequence information:

```
>chr1:206774086-206774694 609bp GCTCAAAGCTGATTTCGGCAG AAGGTCACCTCACTGCAAGGG
GCTCAAAGCTGATTTCGGCAGggcattggtgtacatgaatgetaaccaag
taggattgcaggtttcctagtaggtaagcacaaggcaagatgggaaaca
aaggaaaggagggttcacagcctcaccagagtcagaaacctggcctg
cctggtcccatgctgagtcacttctggaacccagctcagaggggg
gttagacctgaggctaacacagacacagcccaaaaaaccagagccga
ggggaaaggaaaggtgcaagaagggaacccaggtcctgcccctt
ctctctctctctgagcagaactcagacagaaaccttaagcagctta
agtctgcaggaccagtaagttctgagtagctccatagtttctagc
aggctcttctcaactcctgatttctagtttctacattgacactccctg
aagattgggaagagacacacagtcctccctgacctgattcattagtcac
acagcagggaatccacagggtgggctggccctctcatccctccctcc
cactcactcagctggtggccccaaggtgtttgcacCCCTTGCAAGT
AGTGACCTT
```

Below the sequence, the "Primer Melting Temperatures" section provides the following data:

```
Forward: 63.4 C gctcaagctgattcggcag
Reverse: 60.3 C aaggtcactcactgcaagg
```

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](#).

The "Help" section includes the following links:

- [What is chr_alt & chr_fix?](#)
- [Replicating in-Silico PCR results on local machine](#)

Figure 3.6. Confirmation des Résultats par le site UCSC in silico PCR

Discussion

Au cours de cette étude, Nous avons conçus, avec spécificité le couple d'amorces encadrant une partie du gène de l'IL-10. Les amorces, sens et anti-sens : Ce sont de petits brins d'ADN d'environ 20 bases, (appelés oligonucléotides) capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases, sur le brin d'ADN elles sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier. Les amorces, conçues dans cette étude, sont indispensables pour tout travail de recherche concernant le gène de l'IL10. En effet, Ces amorces seront utilisées pour réaliser une PCR pour étudier et détecter l'expression du gène de l'IL-10 au cours de l'asthme allergique.

De nombreuses études ont indiqué que IL-10 joue un rôle anti-inflammatoire, inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires et inhibe aussi la survie des éosinophiles par multiple mécanisme au cours de la pathologie de l'asthme allergique mais l'expression de l'IL10 est significativement diminuée chez les asthmatiques, Et les faibles niveaux d'expression d'IL-10 ont un rôle sur la pathogenèse de l'asthme car cette carence en l'IL-10 permettrait la synthèse sans opposition de cytokines pro-inflammatoires y compris (IL-1, IL6, TNF α) qui contribuent au développement et à la gravité de l'asthme allergique. D'autre part, un niveau élevé d'IL-10 provenant des cellules T régulatrices a un effet protecteur contre l'hyperréactivité et l'inflammation des voies respiratoires. Cependant cette interleukine suggère un domaine potentiel pour une enquête future pour évaluer son pertinence potentielle pour la médecine à travers ses applications cliniques dans le traitement de l'asthme allergies pédiatrique.

Des études précédentes ont indiqué que Les origines et mécanisme derrière le manque d'induction de l'IL-10 dans les cellules des patients asthmatique est lié a une carence en vitamine D chez les enfants asthmatique. Une autre étude précédente ont suggéré que la sécrétion d'IL-10 était largement déterminée (74%) par des facteurs héréditaires (Westendorp et al., 1997) À ce jour, plus d'une centaine de gènes à risque ont été identifiés comme étant associés avec une sensibilité à l'asthme. Parmi ceux-ci, les trois polymorphismes du promoteur de l'IL-10 (rs1800896 ou rs1800871 ou rs1800872) ont été intensivement enquêtés. Des preuves croissantes indiquent que ces polymorphismes peuvent influencer sur la sécrétion d'IL-10. Zhang et al. (2002). Cependant déterminer le risque génétique est une condition fondamentale pour la mise en œuvre des essais de prévention primaire de l'asthme allergique.

Chapitre 05. Conclusion et perspective

Conclusion et perspective

L'asthme allergique est la maladie chronique la plus fréquente chez les enfants, cette maladie est caractérisée par une inflammation bronchique, avec une augmentation des taux d'Ig E totales, et la sécrétion de cytokines "Th2" tels que (IL-4, IL-5 et IL-13) ainsi que d'autres cytokines pro-inflammatoires, y compris IL-1, TNF α , IL-6 qui conduisent au recrutement, accumulation des éosinophiles dans le poumon, la libération de ces cytokines est inhibée par l'IL-10 qui y est connu par son profil anti-inflammatoire qui inhibe la synthèse des cytokines pro-inflammatoires et inhibe aussi la survie des éosinophiles par multiple mécanisme au cours de l'asthme allergique. Cependant une réduction dans la production de l'IL-10 lors du contact avec l'antigène peut faciliter le développement de l'asthme allergique en biaisant les réponses immunitaires vers le développement des cellules TH2 et le développement de l'atopie et / ou de l'asthme infantile.

A l'issue de ce travail, portant sur le profil anti-inflammatoire de l'IL-10 au cours de l'asthme allergique pédiatrique on a réalisé une conception des amorces spécifiques qui encadrent le gène de l'IL-10 afin d'évaluer par la suite une étude sur l'expression de IL-10 au cours de l'asthme allergique

En termes prédictive, des études approfondies sont nécessaires pour une cible thérapeutique par cette cytokine dans le traitement de l'asthme allergique.

De plus il serait important d'étudier l'effet de la vitamine D qui est connue pour son effet modulateur des réponses inflammatoires dans l'expression de l'IL-10 au cours de l'asthme allergique.

Chapitre 06. Bibliographie

A

Akdis, Cezmi A., et Mübeccel Akdis. 2011. « Mechanisms of Allergen-Specific Immunotherapy ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127 (1): 18-27. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.11.030>.

Akdis, Mübeccel, et Cezmi A. Akdis. 2007. « Mechanisms of Allergen-Specific Immunotherapy ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119 (4): 780-89. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.01.022>.

B

Barcik, Weronika, Rozlyn C.T. Boutin, Milena Sokolowska, et B. Brett Finlay. 2020. « The Role of Lung and Gut Microbiota in the Pathology of Asthma ». *Immunity* 52 (2): 241-55. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.01.007>.

Biagini Myers, Jocelyn M., Eric Schauburger, Hua He, Lisa J. Martin, John Kroner, Gregory M. Hill, Patrick H. Ryan, et al. 2019. « A Pediatric Asthma Risk Score to Better Predict Asthma Development in Young Children ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 143 (5): 1803-1810.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.09.037>.

Bollinger, Mary Elizabeth, Arlene Butz, Mona Tsoukleris, Cassia Lewis-Land, Shawna Mudd, et Tricia Morpew. 2019. « Characteristics of Inner-City Children with Life-Threatening Asthma ». *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 122 (4): 381-86. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2019.02.002>.

Bonato, Matteo, Mariaenrica Tiné, Erica Bazzan, Davide Biondini, Marina Saetta, et Simonetta Baraldo. 2019. « Early Airway Pathological Changes in Children: New Insights into the Natural History of Wheezing ». *Journal of Clinical Medicine* 8 (8): 1180. <https://doi.org/10.3390/jcm8081180>.

Borish, Larry. 1998. « IL-10: Evolving Concepts☆☆☆★★★ ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 101 (3): 293-97. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(98\)70238-6](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(98)70238-6).

Branchett, William J., Helen Stölting, Robert A. Oliver, Simone A. Walker, Franz Puttur, Lisa G. Gregory, Leona Gabryšová, Mark S. Wilson, Anne O'Garra, et Clare M. Lloyd. 2020. « A T Cell–myeloid IL-10 Axis Regulates Pathogenic IFN- Γ –dependent

Immunity in a Mouse Model of Type 2–low Asthma ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 145 (2): 666-678.e9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.08.006>.

C

Cutz, E. 2002. « Ultrastructure of Airways in Children with Asthma. E. Cutz, H. Levison, D. M. Cooper. *Histopathology* 1978; 2; 407-421. AUTHOR COMMENTARY ». *Histopathology* 41 (3a): 19-19. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2002.14721.x>.

D

Dharmage, Shyamali C., Jennifer L. Perret, et Adnan Custovic. 2019. « Epidemiology of Asthma in Children and Adults ». *Frontiers in Pediatrics* 7 (juin). <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00246>.

E

Eiringhaus, Kathrin, Harald Renz, Paolo Matricardi, et Chrysanthi Skevaki. 2019. « Component-Resolved Diagnosis in Allergic Rhinitis and Asthma ». *The Journal of Applied Laboratory Medicine* 3 (5): 883-98. <https://doi.org/10.1373/jalm.2018.026526>.

H

Hamzaoui, Agnes, Haifa Maalmi, Anissa Berraïes, Eya Tanguouru, Jamel Ammar, Hanadi Abid, et Agnes Hamzaoui. 2012. « The Impact of Vitamin D Deficiency on Immune T Cells in Asthmatic Children: A Case-Control Study ». *Journal of Asthma and Allergy*, mai, 11. <https://doi.org/10.2147/JAA.S29566>.

Hartl, Dominik, Barbara Koller, Alexander T. Mehlhorn, Dietrich Reinhardt, Thomas Nicolai, Dolores J. Schendel, Matthias Griese, et Susanne Krauss-Etschmann. 2007. « Quantitative and Functional Impairment of Pulmonary CD4+CD25hi Regulatory T Cells in Pediatric Asthma ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119 (5): 1258-66. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.02.023>.

Huang, Z.Y., B.J. Cheng, Y. Wan, et C. Zhou. 2016. « Meta-Analysis of the IL-10 Promoter Polymorphisms and Pediatric Asthma Susceptibility ». *Genetics and Molecular Research* 15 (2). <https://doi.org/10.4238/gmr.15028320>.

Hyun, Myung-Han, Chung-Ho Lee, Min-Hyung Kang, Bong-Kyung Park, et Young Ho Lee. 2013. « Interleukin-10 Promoter Gene Polymorphisms and Susceptibility to Asthma: A Meta-Analysis ». Édité par Edward Gautier Brooks. *PLoS ONE* 8 (1): e53758. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053758>.

J

Jutel, Marek, Mübeccel Akdis, Ferah Budak, Carmen Aebischer-Casaulta, Maria Wrzyszczyk, Kurt Blaser, et Cezmi A. Akdis. 2003. « IL-10 and TGF- β Cooperate in the Regulatory T Cell Response to Mucosal Allergens in Normal Immunity and Specific

Immunotherapy ». *European Journal of Immunology* 33 (5): 1205-14.

<https://doi.org/10.1002/eji.200322919>.

L

Létuvé, S., et C. Taillé. 2013. « Physiopathologie de la réponse inflammatoire dans l'asthme de l'adulte ». *EMC - Pneumologie* 10 (2): 1-8. [https://doi.org/10.1016/S1155-195X\(12\)50795-4](https://doi.org/10.1016/S1155-195X(12)50795-4).

Lin, Chu-Lun, George Hsiao, Ching-Chiung Wang, et Yueh-Lun Lee. 2016. « Imperatorin Exerts Antiallergic Effects in Th2-Mediated Allergic Asthma via Induction of IL-10-Producing Regulatory T Cells by Modulating the Function of Dendritic Cells ».

Pharmacological Research 110 (août): 111-21.

<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.04.030>.

M

Mastorilli, Carla, Daniela Posa, Francesca Cipriani, et Carlo Caffarelli. 2016. « Asthma and Allergic Rhinitis in Childhood: What's New ». *Pediatric Allergy and Immunology* 27 (8): 795-803. <https://doi.org/10.1111/pai.12681>.

Mathys, V., P. Lefèvre, V. Fontaine, M. Dehem, P.Y. Donnio, F. Février, A. Le Coustumier, et P. Bifani. 2007. « La PCR en temps réel : principe et application en infectiologie ». *Antibiotiques* 9 (3): 205-11. [https://doi.org/10.1016/S1294-5501\(07\)91380-1](https://doi.org/10.1016/S1294-5501(07)91380-1).

Möller, Christian, Sten Dreborg, Hosne A. Ferdousi, Susanne Halken, Arne Høst, Lars Jacobsen, Antti Koivikko, et al. 2002. « Pollen Immunotherapy Reduces the Development of Asthma in Children with Seasonal Rhinoconjunctivitis (the PAT-Study) ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 109 (2): 251-56.

<https://doi.org/10.1067/mai.2002.121317>.

Moore, Kevin W., Rene de Waal Malefyt, Robert L. Coffman, et Anne O'Garra. 2001. « INTERLEUKIN -10 AND THE INTERLEUKIN -10 RECEPTOR ». *Annual Review of Immunology* 19 (1): 683-765. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.683>.

Mullis, Kary B. 1990. « The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction ». *Scientific American* 262 (4): 56-65. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0490-56>.

N

Nafti, Salim, Samya Taright, Mustapha El Ftouh, Najiba Yassine, Ali Benkheder, Hend Bouacha, Hachemi Fakhfakh, Moufida Ali-Khoudja, Nathalie Texier, et Abdelkader El Hasnaoui. 2009. « Prevalence of Asthma in North Africa: The Asthma Insights and Reality in the Maghreb (AIRMAG) Study ». *Respiratory Medicine* 103 (décembre): S2-11. [https://doi.org/10.1016/S0954-6111\(09\)70022-8](https://doi.org/10.1016/S0954-6111(09)70022-8).

O

Ogawa, Yoshiko, Enrico Duru, et Bill Ameredes. 2008. « Role of IL-10 in the Resolution of Airway Inflammation ». *Current Molecular Medicine* 8 (5): 437-45. <https://doi.org/10.2174/156652408785160907>.

Önell, A., A. Whiteman, B. Nordlund, F. Baldracchini, G. Mazzoleni, G. Hedlin, H. Grönlund, et J. R. Konradsen. 2017. « Allergy Testing in Children with Persistent Asthma: Comparison of Four Diagnostic Methods ». *Allergy* 72 (4): 590-97. <https://doi.org/10.1111/all.13047>.

Ouyang, Wenjun, et Anne O'Garra. 2019. « IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: From Basic Science to Clinical Translation ». *Immunity* 50 (4): 871-91. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.020>.

P

Peters, Michael C, et Sally E Wenzel. 2020. « Intersection of Biology and Therapeutics: Type 2 Targeted Therapeutics for Adult Asthma ». *The Lancet* 395 (10221): 371-83. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)33005-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)33005-3).

Pletnev, Sergei, Eugenia Magracheva, Alexander Wlodawer, et Alexander Zdanov. 2005. « [No Title Found] ». *BMC Structural Biology* 5 (1): 10. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-5-10>.

Pretolani, M. 1999. « Interleukin-10: An Anti-Inflammatory Cytokine with Therapeutic Potential ». *Clinical & Experimental Allergy* 29 (9): 1164-71. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.1999.00456.x>.

Pretolani, Marina, et Michel Goldman. 1997. « IL-10: A Potential Therapy for Allergic Inflammation? » *IMMUNOLOGY TODAY*, 4.

R

Richards, Jessika R., et Janice L. Stumpf. 2018. « House Dust Mite Sublingual Immunotherapy for Pediatric Patients With Allergic Asthma ». *Annals of Pharmacotherapy* 52 (10): 1019-30. <https://doi.org/10.1177/1060028018769443>.

S

Sabat, Robert, Gerald Grütz, Katarzyna Warszawska, Stefan Kirsch, Ellen Witte, Kerstin Wolk, et Jens Geginat. 2010. « Biology of Interleukin-10 ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 21 (5): 331-44. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2010.09.002>.

Schülke, Stefan. 2018. « Induction of Interleukin-10 Producing Dendritic Cells As a Tool to Suppress Allergen-Specific T Helper 2 Responses ». *Frontiers in Immunology* 9 (mars). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00455>.

Speiran, Kelly, Daniel P. Bailey, Josephine Fernando, Matthew Macey, Brian Barnstein, Motunrayo Kolawole, Dana Curley, et al. 2009. « Endogenous Suppression of Mast Cell Development and Survival by IL-4 and IL-10 ». *Journal of Leukocyte Biology* 85 (5): 826-36. <https://doi.org/10.1189/jlb.0708448>.

T

Till, Stephen J., James N. Francis, Kayhan Nouri-Aria, et Stephen R. Durham. 2004. « Mechanisms of Immunotherapy ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113 (6): 1025-34. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.03.024>.

U

Uhel, F., L. Zafrani, et Commission de la recherche translationnelle de la Société de réanimation de langue française. 2019. « Nouvelles techniques de biologie moléculaire ». *Médecine Intensive Réanimation*. <https://doi.org/10.3166/rea-2019-0119>.

V

Vakili, Mahshid, Masoud Aliyali, Vida Mortezaee, Seyed Alireza Mahdavian, Mihan Poorabdollah, Maryam Sadat Mirenayat, Atefeh Fakharian, et al. 2020. « Relationship between Spirometry Results and Colonisation of *Aspergillus* Species in Allergic Asthma ». *The Clinical Respiratory Journal*, avril. <https://doi.org/10.1111/crj.13192>.

Vasiliou, J. E., S. Lui, S. A. Walker, V. Chohan, E. Xystrakis, A. Bush, C. M. Hawrylowicz, S. Saglani, et C. M. Lloyd. 2014. « Vitamin D Deficiency Induces Th2 Skewing and Eosinophilia in Neonatal Allergic Airways Disease ». *Allergy* 69 (10): 1380-89. <https://doi.org/10.1111/all.12465>.

W

Williams, P., A. Önell, F. Baldracchini, V. Hui, S. Jolles, et T. El-Shanawany. 2016. « Evaluation of a Novel Automated Allergy Microarray Platform Compared with Three Other Allergy Test Methods: Evaluation of an Automated Microarray Allergy System ». *Clinical & Experimental Immunology* 184 (1): 1-10. <https://doi.org/10.1111/cei.12721>.

Yang, Yi, Hong-Liang Zhang, et Jiang Wu. 2010. « Role of T Regulatory Cells in the Pathogenesis of Asthma ». *Chest* 138 (5): 1282-83. <https://doi.org/10.1378/chest.10-1440>.

Z

Zdanov, Alexander. 2004. « Structural Features of the Interleukin-10 Family of Cytokines ». *Current Pharmaceutical Design* 10 (31): 3873-84. <https://doi.org/10.2174/1381612043382602>.

Zdanov, Alexander, Céline Schalk-Hihi, et Alexander Wlodawer. 1996. « Crystal Structure of Human Interleukin-10 at 1.6 Å Resolution and a Model of a Complex with Its Soluble Receptor ». *Protein Science* 5 (10): 1955-62. <https://doi.org/10.1002/pro.5560051001>.

Zhao, Sheng-tao, et Chang-zheng Wang. 2018. « Regulatory T Cells and Asthma ». *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B* 19 (9): 663-73. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1700346>.

Résumé

Introduction : IL-10 joue un rôle anti-inflammatoire au cours de l'asthme allergique, un niveau élevé d'IL-10 a un effet protecteur contre l'hyperréactivité et l'inflammation des voies respiratoires, cependant l'expression du gène de l'IL-10 au cours de l'asthme allergique suggère des études approfondies pour que plus tard cette IL-10 fasse l'objet d'une étude sur la cible thérapeutique dans le traitement de l'asthme allergique.

Objectif : Notre objectif est de concevoir des amorces du gène de l'IL-10 pour l'étude de profile anti-inflammatoire au cours de l'asthme allergique pédiatrique.

But : Le but de cette étude est de concevoir un bon couple d'amorces spécifiques encadrant le gène d'IL10 afin de réaliser par la suite une PCR réussite pour évaluer et détecter l'expression du gène de l'IL-10 au cours de l'asthme allergique pédiatrique.

Matériel et méthodes : Les séquences génomiques du gène de l'interleukine 10 ont été obtenues grâce à la base de données Ensembl. Le logiciel Primer-Blast a été utilisé pour concevoir des amorces spécifiques encadrant une partie du gène de l'IL-10.

Résultats : Dans un premier temps, des amorces aspécifiques ont été obtenus, ce qui nous a obligés à élargir la séquence à amplifier. Les amorces obtenues sont spécifiques du gène de l'IL-10 et présentent des caractéristiques optimales pour le bon déroulement d'une PCR.

Conclusion : À travers cette étude, nous avons pu concevoir avec spécificité le couple d'amorce qui encadre le gène de l'IL-10 qui seront indispensable pour tout étude concernant le gène du IL-10, ce dernier joue un rôle anti-inflammatoire au cours de l'asthme allergique et il peu avoir un potentiel thérapeutique dans le traitement de l'asthme allergique.

Mots clés: L'asthme allergique pédiatrique, interleukine 10, conception d'amorce, PCR.

Summary

Introduction: IL-10 plays an anti-inflammatory role in allergic asthma, a high level of IL-10 has a protective effect against hyperreactivity and inflammation of the airways, however the expression of the gene of IL-10 in allergic asthma suggests further studies so that IL-10 can later be investigated as a therapeutic target in the treatment of allergic asthma.

Objective: Our objective is to design primers for the IL-10 gene for the study of the anti-inflammatory profile in pediatric allergic asthma.

Aim: The aim of this study is to design a good pair of specific primers flanking the IL10 gene in order to subsequently carry out a successful PCR to evaluate and detect the expression of the IL-10 gene during pediatric allergic asthma.

Materials and methods: The genomic sequences of the interleukin 10 gene were obtained from the Ensembl database. Primer-Blast software was used to design specific primers flanking part of the IL-10 gene.

Results: Firstly, nonspecific primers were obtained, which forced us to expand the sequence to be amplified. The primers obtained are specific for the IL-10 gene and exhibit optimal characteristics for the proper conduct of a PCR.

Conclusion: Through this study, we were able to design with specificity the primer pair which surrounds the IL-10 gene which will be essential for any study concerning the IL-10 gene, the latter plays an anti-inflammatory role. in allergic asthma and may have therapeutic potential in the treatment of allergic asthma.

Keywords: Pediatric allergic asthma, interleukin 10, primer design, PCR.

المقدمة

يلعب IL10 دورًا مضادًا للالتهابات في الربو التحسسي ، كما أن مستوى عالٍ من IL10 له تأثير وقائي ضد فرط النشاط والتهاب الجهاز التنفسي، فلهاذا التعبير عن الجين IL-10 أثناء الربو التحسسي لدى الأطفال يقترح مزيدًا من الدراسات بحيث يكون هذا IL-10 لاحقًا موضوعًا لدراسة عن الهدف العلاجي من أجل علاج الربو التحسسي

الهدف

هدفنا هو تصميم البرامير الجيني IL10 لدراسة الملامح المضادة للالتهابات في الربو التحسسي لدى الأطفال

الإستهداف

الإستهداف من هذه الدراسة هو تصميم زوج جيد من البادئات المحددة المحيطة بجين IL-10 من أجل إجراء PCR ناجح لاحقًا لتقييم واكتشاف تعبير الجين IL10 أثناء الربو التحسسي لدى الأطفال

الوسائل و الطرق:

تم الحصول على التسلسلات الجينومية للجين IL10 من قاعدة بيانات ensembl. تم استخدام برنامج التمهيدي لتصميم برايمر محدد لتأطير جزء من الجين

IL10 النتائج:

في البداية ، تم الحصول على بادئات غير محددة، أجبرتنا على تمديد التسلسل لتضخيمه. البادئات التي تم الحصول عليها محددة للجين IL-10 وتقدم الخصائص المثلى للتطور السليم لـ PCR

الإستنتاج:

من خلال هذه الدراسة ، تمكنا من تصميم الزوج التمهيدي الذي يحدد الجين IL-10 والذي سيكون ضروريًا لأي دراسة تتعلق بجين IL10، حيث يلعب هذا الأخير دورًا مضادًا للالتهابات في الربو. حساسية وقد يكون له إمكانيات علاجية في علاج الربو التحسسي

الكلمات المفتاحية:

الربو التحسسي لدى الأطفال ، أنترلوكين 10 ، تصميم تمهيدي ، PCR