

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 MOLECULAIRE APPLIQUEE ET IMMUNOLOGIE W04144100

MEMOIRE

Présenté par

KLOUCHE DJEDID Fatiha Ghizlene

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Immunologie

Thème

Conception d'amorces encadrant les SNP pour le gène du récepteur VDR au cours de l'asthme allergique pédiatrique

Soutenu le 9 Septembre 2020 devant le jury composé de :

Président	ARIBI Morad	Professeur	Université	De Tlemcen , Algérie
Encadreur	EL MEZOUAR Chahrazede	MAA	Université	De Tlemcen , Algérie
Examineur	NOARI Wafaa	MCB	Université	De Tlemcen , Algérie

Année universitaire 2019 / 2020



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 MOLECULAIRE APPLIQUEE ET IMMUNOLOGIE W04144100

MEMOIRE

Présenté par

KLOUCHE DJEDID Fatiha Ghizlene

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Immunologie

Thème

Conception d'amorces encadrant les SNP pour le gène du récepteur VDR au cours de l'asthme allergique pédiatrique

Soutenu le 9 Septembre 2020 devant le jury composé de :

Président	ARIBI Morad	Professeur	Université	De Tlemcen , Algérie
Encadreur	EL MEZOUAR Chahrazede	MAA	Université	De Tlemcen , Algérie
Examineur	NOARI Wafaa	MCB	Université	De Tlemcen , Algérie

Année universitaire 2019 / 2020

Introduction :

La modulation du système immunitaire est l'un des principaux rôles de la vitamine D, dont les effets sont exercés via le récepteur de la vitamine D (VDR). Surtout, les variants du gène VDR ont été susceptibles d'augmenter le risque d'asthme chez les enfants .

Objectif : Concevoir des amorces qui encadrent SNP du gène du récepteur VDR afin d'établir une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) correcte qui va par la suite aider à la recherche et aux études de l'expression des gènes responsables de la pathogénèse de l'asthme allergique pédiatrique.

Matériels et méthodes : l'élaboration d'amorces spécifique au SNP (taq1, fok1) du gène VDR impliqué dans l'asthme allergique pédiatrique avec un logiciel de bioinformatique Ensembl et une base de données pour l'information biologique moléculaire NCBI et à l'aide de Primer-BLAST un outil pour trouver des amorces spécifiques .

Résultats :

L'amorce obtenue encadrant snp (taq1) :

Forward primer : 60.9 C accagggttttgcagggtct

Reverse primer : 59.7 C aggactctgactctgttcccc

- La taille de l'amorce 298

L'amorce obtenue encadrant snp (fok1) :

Forward primer : 60.0 C ctggcaagagaggactggac

Reverse primer : 63.7 C aatgcttgcccctgagttcc

- la taille de l'amorce 766

Conclusions : Les études d'association génétique représentent une étape majeure dans la compréhension des mécanismes moléculaires, à l'origine des pathologies humaines comme l'asthme allergique pédiatrique . Ces études consistent à mettre en évidence d'éventuelles associations statistiquement significatives entre des variants génétiques et la survenue de certaines pathologies. Les plus étudiés de ces variants génétiques dans ce genre d'études étant les SNP (single nucleotide polymorphism) .

L'analyse génétique de ce genre de variants peut se faire par diverses techniques, la plus communément utilisée est la technique PCR.

Notre travail constitue donc l'étape préliminaire ou initiale pour l'élaboration d'une PCR efficace qui est la conception d'amorce.

Mots clé : asthme allergique pédiatrique, vitamine D, VDR, conception, amorce, PCR.

Abstract

Background. Modulation of the immune system is one of the main roles of vitamin D, the effects of which are exerted through the vitamin D receptor (VDR). Importantly, variants of the VDR gene have been thought to increase the risk of asthma in children

Objective. To design primers which frame SNP of the VDR receptor gene in order to establish a correct polymerase chain reaction (PCR) which will subsequently aid in the research and studies of the expression of the genes responsible for the pathogenesis of pediatric allergic asthma.

Material and methods. the development of primers specific to the SNP (Taq1, Fok1) of gene VDR involved in allergic pediatric asthma with a software bioinformatics Ensembl and a given base for molecular biological information NCBI and the Using Primer-BLAST a tool to find specific primers .

Results.

The primer obtained framing snp (Taq1) :

Forward primer : 60.9 C accaggTTTTgcagggtct

Reverse primer : 59.7 C aggactctgactctgttcccc

- The size of the primer 298

The primer obtained framing snp (Fok1) :

Forward primer : 60.0 C ctggcaagagaggactggac

Reverse primer : 63.7 C aatgctgcccctgagttcc

- the size of the primer 766

Conclusions. Genetic association studies represent a major step in the understanding of the molecular mechanisms, at the origin of human pathologies such as pediatric allergic asthma .These studies consist in highlighting any statistically significant associations between genetic variants and the occurrence of certain pathologies. The most studied of these varying s genetic in such studies is the SNP .

The genetic analysis of this kind of variants can be done by various techniques, the most commonly used is the PCR technique .Our work is therefore the preliminary or initial stage in the development of PCR effective is the design of primer .

Keywords. pediatric allergic asthma , vitamin D, VDR, designer , primer, PCR.

ملخص

المقدمة:

يعد تعديل الجهاز المناعي أحد الأدوار الرئيسية لفيتامين د ، والذي تحدث آثاره من خلال مستقبل فيتامين د (VDR). الأهم من ذلك وُجد أن المتغيرات من جين VDR تزيد من خطر الإصابة بالربو عند الأطفال.

هدف: تصميم البرايمر الذي يحيط بالنيوكليوتايد SNPs لجين مستقبل VDR من أجل إنشاء تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) الصحيح الذي سيساعد لاحقاً في البحث ودراسة التعبير عن الجينات المسؤولة عن التسبب في الربو التحسسي للأطفال.

الوسائل و الطرق : تطوير برايمر خاصة بـ SNP taq1 ، SNP fok1 لجين VDR المتورط في الربو التحسسي للأطفال باستخدام برنامج Ensembl للمعلومات الحيوية وقاعدة بيانات المعلومات البيولوجية الجزيئية NCBI واستخدام Primer-BLAST أداة للعثور على مواد أولية محددة.

النتائج:

التمهيدي الناتج المحيط بـ: snp (taq1)

البرايمر إلى الأمام: 60.9 درجة مئوية Accaggtttttgcaggtct
عكس البرايمر: 59.7 درجة مئوية aggactctgactctgttccc

• حجم البرايمر 298

التمهيدي الناتج المحيط بـ: snp (fok1)

البرايمر إلى الأمام: 60.0 درجة مئوية ctggcaagaggactgac
عكس البرايمر 63.7 درجة مئوية : aatgcttgcccctgagt

• حجم البرايمر 766

الاستنتاجات : تمثل دراسات الارتباط الجيني خطوة رئيسية في فهم الآليات الجزيئية الكامنة وراء أمراض الإنسان مثل الربو التحسسي للأطفال. تتكون هذه الدراسات من إبراز أي ارتباطات ذات دلالة إحصائية بين المتغيرات الجينية وحدث أمراض معينة. أكثر هذه المتغيرات الجينية التي تمت دراستها في هذا النوع من الدراسة هي SNPs تعدد أشكال النوكليوتيدات المفردة. يمكن إجراء التحليل الجيني لهذا النوع من المتغيرات من خلال تقنيات مختلفة ، وأكثرها شيوعاً هي تقنية PCR.

لذلك يشكل عملنا الخطوة الأولى أو الأولية لتطوير PCR فعال وهو التصميم التمهيدي.

الكلمات الدالة : الربو التحسسي للأطفال ، فيتامين D ، VDR ، البرايمر ، التمهيدي ، PCR.

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Biologie
Moléculaire Appliquée et
Immunologie (BIOMOLIM), Université de Tlemcen, sous la direction
du Professeur Mourad
ARIBI.

Je tiens tout d'abord à remercier MADAME EL MEZOUAR
(Université Aboubekr Belkaid –Tlemcen) qui a bien voulu accepter de
me prendre en charge pour réaliser ce modeste travail dont le mérite
lui revient grâce à son aide morale, ses conseils précieux et sa
gratitude.

Je tiens à remercier MONSIEUR ARIBI (Université Aboubekr
Belkaid –Tlemcen) pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la
présidence du jury, Qu'il trouve ici mes sincères impressions de
gratitude et de respect.

Mes remerciements vont aussi à Madame NOARI (Université
Aboubekr Belkaid –Tlemcen) d'avoir ménagé son temps pour juger et
critiquer ce travail, qu'elle trouve ici toutes mes expressions
respectueuses.

A Mes Très Chers Parents Amina et Kouider

*Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je
vous porte,
ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les
sacrifices
que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon
bien-être.*

*A ma mère qui a été toujours à mes coté à m'encouragé et à vieillir sur
moi*

*Je vous dédie ce modeste travail en guise de ma reconnaissance
éternelle et de mon infini amour.*

*Que Dieu tout puissant vous garde et vous procure santé, bonheur et
longue vie
pour que vous demeuriez le flambeau illuminant le chemin de vos
enfants.*

A mes deux sœur Hanene et Radjaa et petit frère Nadir

*Vous m'aviez toujours aidé et ces quelques lignes sont insuffisantes pour
exprimer
mon profond amour et ma reconnaissance pour les honorables services
soutenus.*

Que cette thèse vous traduit ma profonde affection.

A ma grande famille

En témoignage de mon respect et de mon amour.

A mes amis

En souvenir des agréables moments partage

Pensé à ma meilleur amie Fatima zohra qui m'a accompagné et soutenue

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
Abstract	iv
Résumé en Arabe	v
Avant-propos	vi
Table des matières	viii
Liste des figures	xi
Liste des tableaux	xiii
Liste des abréviations	xiii
Introduction	1
Chapitre 1 : Revue de la littérature	
1. 1. L'asthme allergique	4
1.1.1. Définition	4
1.1.1.1. L'asthme pédiatrique	4
1.1.1.2. L'asthme sévère	5
1.1.1.3. Phénotypes de l'asthme	5
1.1.2. Epidémiologie	6
1.1.2.1. Les variations de la prévalence de l'asthme	6
1.1.3. Physiopathologie de l'asthme	7
1.1.4. Pathogénèse de l'asthme allergique	7
1.1.4.1. L'inflammation des voies aériennes	7
1.1.4.2. Effecteurs de la réponse inflammatoire	8
1.1.4.2.1. Les mastocytes	9
1.1.4.2.2. Les basophiles	9
1.1.4.2.3. Cellules dendritiques	9
1.1.4.2.4. Éosinophiles	10
1.1.4.2.5. Lymphocytes	10
1.1.5. Les facteurs de risque de l'asthme	10
1.1.5.1. Liaison gastro-intestinale et respiratoire : Microbiome intestinal	10
1.1.5.2. Exposition à la fumée du tabac	12
1.1.5.3. Le stress et l'asthme	12
1.1.5.4. Carence en vitamine D	12
1.1.6. Symptômes et diagnostic	14
1.1.6.1. Le diagnostic initial	14
1.1.6.2. Diagnostic clinique de l'asthme chez le jeune enfant	17
1.1.6.3. Symptômes évocateurs d'asthme chez les enfants de 5 ans et moins	17
1.1.7. Traitement	20
1.1.7.1. Médicaments pour les asthmatiques	20

1.1.7.3. Étapes du traitement de l'asthme pour les enfants de 5ans et plus jeunes	21
1.1.7.4. Conseils provisoires sur la gestion de l'asthme pendant la Pandémie de covid19	21
1.1.8. La prévention contre l'asthme pédiatrique	22
1.2.La Vitamine D	22
1.2.1. Origine	22
1.2.2. Les fonctions de la vitamine D	23
1.2.3. Vitamine D3 et système immunitaire	24
1.2.3.1 Vitamine D3 et Immunité innée	25
1.2.3.2. Vitamine D3 et Immunité adaptative	25
1.2.4 Métabolisme	26
1.2.5. Mécanismes de régulation	28
1.2.6. Vitamine D3 et voies de signalisation	29
1.2.6.1. Voie non génomique	29
1.2.6.2. La voie génomique	30
1.2.7. Analogues synthétiques	31
1.3.Le récepteur de la vitamine D	32
1.3.1. Le gène du VDR	33
1.3.3. Régulation de l'activité du Récepteur de la vitamine D	33
1.3.4. Polymorphismes des séquences du récepteur de la vitamine D	34
1.3.4.1. Polymorphismes étudiés du VDR	34
1.3.5. Polymorphismes du gène VDR et vitamine D3	35
1.3.6. VDR et asthme	36
1.4. Réaction de polymérisation en chaine (PCR)	38
1.4.1. Principes	38
1.4.2. Acteurs de la PCR	40
1.4.3.1. L'acide désoxyribonucléique	40
1.4.2.2. Les amorces sens et antisens	40
1.4.2.3. L'ADN polymérase et ses inhibiteurs	41
1.4.2.4. Les nucléotides dNTPs	41
1.4.2.6. Le Magnésium (Mg ++)	41

1.5. La conception des amorces	41
1.6. Problématique et objectifs	42
1.6.1. Problématique	42
1.6.2. Objectif	42
1.6.3. But	42
Chapitre 2 : Matériels et méthodes	
2.1. L'initiation au travail	44
2.1.1. Introduction	44
2.1.2. Amorces de PCR	44
2.1.3. Identification des meilleures amorces	45
2.1.4. Logiciels et base de donnée utilisé dans le travail	47
2.1.4.1. NCBI	47
2.1.4.1. Primer-BLAST	48
2.1.4.1.1. BLAST	48
2.1.4.1.2. Primer Blast	48
2.1.4.2. Ensembl	48
2.2. Les étapes établies	49
2.2.1. Conception d'amorce pour le SNP Taq-1 (exon 9)	49
2.2.2. Conception d'amorce pour le SNP Fok-1 (exon 2)	59
2.3. Confirmation des résultats	57
Chapitre 3 : Résultats	
3.1. Résultat de la conception d'amorce pour l'exon 9 snp (Taq1)	59
3.2. Résultat de la conception d'amorce pour l'exon 2 snp (Fok1)	60
3.3. La PCR in silico	62
3.3.1. Vérification de l'amorce 9 encadrant le SNP taq-1	62
3.3.2. Vérification de l'amorce 4 encadrant le SNP Fok-1	63
Chapitre 4. Discussion	
Chapitre 5 : Conclusion et perspectives	
3.1. Conclusion et perspectives	68
Chapitre 6 : Bibliographie	69

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Représentation schématique de la cascade d'inflammation dans l'asthme allergique	8
Figure 1.2. Effets immunomodulateurs de la vitamine D sur les cellules inflammatoires dans l'asthme allergique	13
Figure 1.3. Effet de la déficience périnatale VD sur les marqueurs mésenchymateux de la différenciation alvéolaire	14
Figure 1.4. Vitamine D2 ou ergocalciférol (A) et vitamine D3 ou cholécalciférol (B)	23
Figure 1.5 : Biosynthèse de la vitamine D	27
Figure 1.6. le métabolisme de la vitamine D	29
Figure 1.7. Voies de signalisations non génomique et génomique de la forme active de la vitamine D3	31
Figure 1.8. Molécules analogues de la vitamine D capables de se lier au VDR	32
Figure 1.9. Représentation schématique du récepteur de la vitamine D.	33
Figure 1.10 Sites des polymorphismes principaux du gène codant pour le VDR	35
Figure 1.11: Schéma de principe de la technique de PCR	39
Figure 2.1. Exemple d'Alignement d l'amorce sur le brin model d'ADN	44
Figure 2.2. L'utilité d'une amorce	45
Figure 2.3. Représentation de la formation d'épingle à cheveux et boucle de tige entre l'amorce et le brin model.	46
Figure 2.4. Formation de dimère d'amorce	47
Figure 2.5. Plateforme de la base de données ensembl	50
Figure 2.6. Etablissement de la recherche du gène VDR dans la plateforme ensembl	51
Figure 2.7 le code de la séquence complète du gène VDR sur la plateforme Ensembl	51
Figure 2.8. La séquence du gène VDR en rouge foncé correspondant à l'exon 9 (SNP Taq-1 présent au niveau de ce exon)	52
Figure 2.9. (A) et (B) correspond à Séquence du gène VDR prise depuis la base de données encadrant la partie qui nous intéressent (exon 9).	53
Figure 2.10. Primer Blast	54
Figure 2.11. Définition de la séquence d'interet (snp Taq1) et le Forward primer Reverse primer dans le Primer Blast	54

Figure 2.12. Définir le “ Primer pair specificity checking parameters”	55
Figure 2.13. Séquence du gène VDR prise depuis la base de données encadrant la partie qui nous intéressent (exon 2).	55
Figure 2.14. Définition de la séquence d’interet (snp Fok 1) et le Forward primer, Reverse primer dans le Primer Blast	56
Figure 2.9. Résultat graphique de la conception d’amorce de l’exon 9	56
Figure 2.10. Résultat obtenu avec primer –blaste (exon 9)	57
Figure 2.11. La séquence du gène VDR avec en rouge foncé correspondant à l’exon 2 SNP Fok1 présent au niveau de cet exon	58
Figure 2.12. Séquence du gène VDR prise depuis la base de données encadrant la partie qui nous intéressent (exon 2).	59
Figure 2.13. Résulta graphique de la conception d’amorce de l’exon 2	60
Figure 2.14. Résultat obtenu avec primer –blaste (exon 2)	61
Figure 2.15. Vérification des résultats avec UCSC In-Silico PCR pour l’amorce 9	62
Figure 2.16. Vérification des résultats avec UCSC In-Silico PCR pour l’amorce 4	63

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1. Critères de diagnostic de l'asthme chez l'adulte, adolescents, enfants 6-11ans)	16
Figure1.2. Caractéristiques suggérant un diagnostic d'asthme chez les enfants de 5 ans et moins	18
Tableau 1.3. Tableau Principaux sites de stockage de la vitamine D	24
Tableau 1.4. Tableau Apports nutritionnels recommandés (ANC)	24

LISTE DES ABRÉVIATIONS

1,25 (OH) 2D : 1,25 dihydroxyvitamine D

25(OH)D3 : 25OH vitamine D3 ou calcidiol

A

AF2 : domaine transactivateur

Ala : alanine

ADN : acide désoxyribonucléique

ANC : Apports nutritionnels recommandés

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ARC : cellules souches stromales dérivées adipeuses

C

CCR7 : récepteur de chimokine c-c

CCL19 : ligand du récepteur CCR7

CCL21 : ligand du récepteur CCR7

CI : corticoïdes inhalés

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CMHII : complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

CO-A : coenzyme A

COVID 19 : corona virus

CpG : Chromatographie en phase gazeuse

CSO : corticostéroïdes oraux

CSI : corticostéroïde inhalé

CYP24A1 : L'enzyme catabolique de la vitamine D3

CYP27B1 : La 25-hydroxyvitamine D₃ 1-alpha-hydroxylase

D

D2 : ergocalciférol

D3 : cholécalciférol

DATP , DGTP , DTTP : désoxyNucléotides-Triphosphates (A-G-T)

DBP : la protéine de liaison à la vitamine D

DBD : Domaine de liaison à l'ADN

DC : cellules dendritiques

E

ECP : protéine cationique des éosinophiles

EPO : peroxidase d'éosinophile

EDN : la neurotoxine dérivée des éosinophiles

F

FEV 1 : volume expiratoire forcé en 1 seconde

FVC : Capacité vitale forcée

FGF-23 : Facteur 23 de croissance du fibroblaste

G

GRP58 : la Glucose-régulatrice de protéine 58

Glu : glutamine

G : guanine

H

HAT : histone acétylases

HRB : hyperréactivité bronchique

I

IFN : interféron

IFN γ : interféron gamma

IgE : immunoglobuline E

IGF1 : facteur de croissance analogue à l'insuline-1

IL : interleukine

V

VDR : récepteur nucléaire de la vitamine D

VDRE : élément de réponse à la vitamine

L

LB : lymphocytes B

LBD : domaine de liaison du ligand

LT : lymphocytes T

LTCD4+ : lymphocyte T CD4+

M

MARRS : Membrane Rapid d'association de stéroïde réponse

MBP : la protéine basique majeure

Met : méthionine

MiARNs :

Mg²⁺ : magnésium

N

NF-KB : facteur nucléaire-kappa B

NK : tueur naturel

P

PAMP : motifs associés aux pathogènes

PCR : réaction de polymérisation en chaîne

Pdia3 : la protéine disulfide isomérase de la 3 famille

PEF : la valeur à laquelle toutes les autres valeurs de débit de pointe seront comparées.

PKC : Protéine Kinase C

PPAR : Récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes

PTH : Parathormone

R

RXR : Le récepteur X de rétinoïdes

S

SABA : Le salbutamol ou bêta- 2 agoniste

SEP : La sclérose en plaques

SMA : actine des muscles lisses

SNP : Polymorphisme nucléotidique unique

SUG1 : composant du proteasome, intervenant dans l'ubiquitination et la protéolyse du VDR

T

T : thymine

Th1, Th2, Th17 : lymphocytes auxiliaires 1,2,17

TLR : toll like receptor

Tm : Les températures de fusion

TNF : facteur de nécrose tumoral

Treg : lymphocytes régulateur

U

UV : rayons ultraviolets

V

VDR : récepteur de la vitamine D

VDRE : élément de réponse à la vitamine D

VEMS : 80% du volume maximal inspiré

INTRODUCTION

L'asthme allergique est une maladie pulmonaire chronique courante et considérée comme un problème de santé publique majeur concernant les enfants comme les adultes, touchant environ 6,3 millions d'enfants dans le monde, et son incidence et sa mortalité sont en augmentation ces dernières années. Bien qu'il existe une prédisposition génétique, c'est l'exposition aux allergènes environnementaux, aux irritants et aux infections qui détermine la sensibilisation aux divers allergènes diététiques et inhalés.

Les patients avec l'asthme se manifestent cliniquement par une respiration sifflante récurrente, toux et dyspnée, et principalement traités par l'inhalation de glucocorticoïdes; bien que cette méthode puisse supprimer le développement de la maladie rapidement, prévenir l'exacerbation de l'asthme et réduire l'asthme mais cette thérapie a souvent de graves complications à l'enfants affectant leur développement, la santé physique et mentale.

Cette maladie inflammatoire chronique des voies respiratoires à une sensibilité génétique, impliquant une variété de cellules inflammatoires, de médiateurs inflammatoires et de cytokines et caractérisé par une hyperréactivité des voies aériennes et un remodelage des voies aériennes.

La pathogenèse est complexe et dépend de l'interaction de la génétique, facteurs environnementaux et hormonaux.

Quelques études d'observation ont suggéré une association entre un faible niveau sérique de vitamine D et un mauvais contrôle de l'asthme et la fonction pulmonaire chez les enfants.

Au cours de la dernière décennie, il y a eu un intérêt croissant dans le rôle de la vitamine D dans l'asthme (La vitamine D est un nutriment essentiel ayant des effets immunomodulateurs importants par l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T (LT), la synthèse des cytokines et la libération d'interleukine 10 (IL-10) par LT régulateurs).

Il y a eu de nombreuses études qui ont suggéré que la carence en vitamine D jouent un rôle dans la sévérité des symptômes.

D'autre part, la littérature montre que la carence et l'insuffisance en vitamine D indiquent qu'il est d'une grande importance dans la survenue et le développement de l'asthme bronchique chez les enfants et peut induire des allergies facteurs conduisant ainsi à l'asthme.

Quand on parle de vitamine on fait appelle à son récepteur VDR qui fait partie de la superfamille des récepteurs des stéroïdes / hormones thyroïdiennes. Le récepteur de la vitamine D (VDR) humain est situé sur le bras long de chromosome 12 et il est exprimé dans de nombreuses cellules immunitaires et les tissus immunitaires, y compris le sang

INTRODUCTION

périphérique mononucléaire cellules, cellules T et B activées, cellules dendritiques, thymus et lymphes nœuds.

Après la liaison au VDR, la vitamine D peut servir de médiateur à l'effets biologiques multiples, y compris la régulation immunologique.

Il est rapporté que le VDR est un gène candidat associé à l'asthme, un grand nombre de rapports ont indiqué un polymorphisme génétique liés au métabolisme de la vitamine D et à la voie fonctionnelle.

Donc le polymorphisme du gène VDR est étroitement associé à l'apparition de l'asthme et gravité de la maladie.

Notre travail consiste à établir une relation entre la carence en vitamine D et le récepteur VDR sont polymorphisme dans l'asthme allergique pédiatrique.

Objectif

Concevoir des amorces qui encadrent SNP du gène du récepteur VDR afin d'établir une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) correcte qui va par la suite aider à la recherche et aux études de l'expression des gènes responsables de la pathogénèse de l'asthme allergique pédiatrique.

CHAPITRE 1

Revue de la littérature

1. 1. L'asthme allergique	4
1.2.La Vitamine D	22
1.3.Le récepteur de la vitamine D	32
1.4. Réaction de polymérisation en chaine (PCR)	38

CHAPITRE 1

Revue de la littérature

1. 1. L'asthme allergique

1.1.1. Définition

L'asthme est une maladie respiratoire chronique courante qui affecte 1 à 18% de la population de différents pays.

L'asthme se caractérise par des symptômes variables de respiration sifflante, d'essoufflement, d'oppression thoracique et / ou toux, et par limitation variable du débit d'air expiratoire.

Les symptômes et la limitation du débit d'air varient de façon caractéristique au fil du temps et en intensité. Ces variations sont souvent déclenchées par des facteurs tels que l'exercice, l'exposition aux allergènes ou aux irritants, intempéries ou infections respiratoires virales.

Ces symptômes et la limitation du débit d'air peuvent disparaître spontanément ou en réponse aux médicaments, et peuvent parfois être absent pendant des semaines ou des mois à la fois. D'un autre côté, les patients peuvent subir des poussées épisodiques (exacerbations) de l'asthme qui peut mettre la vie en danger et porter un fardeau important pour les patients et la communauté.

L'asthme est généralement associé à une hyperréactivité des voies aériennes à des stimuli directs ou indirects et à une inflammation des voies respiratoires chroniques. Ces caractéristiques persistent généralement, même en l'absence de symptômes ou lorsque la fonction pulmonaire est normale, mais normaliser avec le traitement. (Global Initiative for Asthma 2020)

1.1.1.1. L'asthme pédiatrique

L'asthme est la maladie chronique la plus courante de l'enfance et la principale cause de morbidité infantile, mesurée par les absences à l'école, les visites aux urgences et les hospitalisations.

Les symptômes commencent pendant l'enfance. L'apparition de l'asthme est plus tôt chez les mâles que chez les femelles. Aucune intervention n'a encore été montrée pour empêcher le développement de l'asthme ou modifier son évolution naturelle à long terme. L'atopie est présente chez la majorité des enfants asthmatiques âgés de plus de 3 ans et sensibilisés aux allergènes (et particulièrement les multiples sensibilisations précoces) est l'un des facteurs de

risque les plus importants pour le développement de l'asthme.(Global Initiative for Asthma 2020)

1.1.1.2. L'asthme sévère

L'asthme sévère est défini comme l'asthme qui nécessite un traitement avec des corticostéroïdes inhalés à haute dose (CSI) , des bronchodilatateurs (et/ ou corticostéroïde systémique) pour l'empêcher de devenir «incontrôlé» ou de rester «Incontrôlée».(Haktanir Abul et Phipatanakul 2019).

- la prévalence de l'asthme sévère chez l'enfant peut atteindre 5% dans les populations asthmatiques.(Ahmed et Turner 2019).

1.1.1.3. Phénotypes de l'asthme

De nombreux phénotypes cliniques de l'asthme ont été identifiés. les plus courants sont :

• L'asthme allergique : c'est le phénotype de l'asthme le plus facilement reconnu, qui commence souvent dans l'enfance et associée à des antécédents familiaux et / ou antécédents de maladie allergique comme l'eczéma, la rhinite allergique ou un aliment ou un médicament d'allergie. L'examen des expectorations induites de ces patients avant le traitement révèle souvent une inflammation éosinophile des voies aériennes. Les patients atteints de ce phénotype d'asthme répondent généralement bien au traitement par des CSI.

• Asthme non allergique : certains patients souffrent d'asthme non associé à une allergie. Le profil cellulaire des expectorations de ces patients peuvent être neutrophiles, éosinophiles ou contenir seulement quelques cellules inflammatoires. Les patients souffrant d'asthme non allergique présentent souvent une réponse à court terme moins importante au CSI.

• Asthme à début adulte (début tardif) : certains adultes, en particulier les femmes, présentent de l'asthme pour la première fois dans la vie adulte. Ces patients ont tendance à être non allergiques et nécessitent souvent des doses plus élevées de CSI ou sont relativement réfractaires à traitement aux corticostéroïdes. L'asthme professionnel (c'est-à-dire l'asthme dû à des expositions au travail) doit être exclu chez les patients présentant un asthme d'apparition adulte.

- Asthme avec limitation persistante du débit d'air : certains patients souffrant d'asthme de longue date développent une limitation du débit persistante ou incomplètement réversible. On pense que cela est dû au remodelage des parois des voies respiratoires.
- Asthme avec obésité : certains patients obèses souffrant d'asthme ont des symptômes respiratoires importants et légère inflammation éosinophile des voies respiratoires.

(Global Initiative for Asthma 2020)

1.1.2. Epidémiologie

La maladie chronique la plus fréquente en pédiatrie : 10 % des enfants d'âge scolaire. Début des premières crises au cours de la 1^{ère} année dans 10 à 50%, et avant la 5^{ème} année dans 65 à 95% des cas. Il existe une prédominance masculine.(Bellaïche et Pham 2017).

1.1.2.1. Les variations de la prévalence de l'asthme

La prévalence de cette maladie est variable d'un pays à l'autre et observe de grandes disparités d'une région à l'autre. Au cours des 20 à 30 dernières années, la fréquence des maladies allergiques a augmenté de manière considérable.

- En Algérie, la prévalence de l'asthme chez l'enfant est estimée à 8,7%.(Dutau et Lavaud 2016)

L'étude internationale multicentrique, International Study of Asthma and Allergies in Childhood au cours des années 1990 initiée à l'évaluation de la prévalence de l'asthme chez l'enfant et à la détermination des facteurs mis en cause de ces prévalences dans différentes régions du monde. (Smati-Bourtet et Arrada 2010).

Cette étude s'est déroulée en plusieurs phases, dans 2 groupes d'âge différents 6- 7ans (38 pays) et 13-14 ans, (56 pays):

La phase I a montré d'importantes variations géographiques dans la prévalence et la sévérité de l'asthme et a permis de distinguer 3 groupes de pays selon le taux de prévalence : faible (<5%), moyen (5-10%) et fort (> 10%). L'Algérie se situe dans le groupe de moyenne prévalence. (Smati-Bourtet et Arrada 2010).

Au cours de la phase III, on note une stabilisation de la prévalence de l'asthme chez l'adolescent des pays industrialisés durant la dernière décennie, en revanche l'augmentation se poursuit dans les pays en voie de développement.

Les causes de cette augmentation sont mal connues, mais elles combinent probablement une augmentation des expositions aux allergènes et aux polluants et une perte de facteurs protecteurs immunologiques. (Smati-Bourtel et Arrada 2010).

- L'Algérie a participé à l'étude ISAAC phase I - phase III. Les chiffres de prévalence montrent une hausse de 5,9% à 8,7% entre les deux phases. (Dutau et Lavaud 2016).

1.1.3. Physiopathologie de l'asthme

Cette maladie inflammatoire implique différents types de cellules et de nombreux médiateurs. L'inflammation chronique des bronches est associée à une hyperréactivité bronchique (HRB) à l'origine d'épisodes récurrents de sibilants, de dyspnée, d'oppression thoracique et de toux. (Bellaïche et Pham 2017).

Cette inflammation est une réponse de la muqueuse bronchique à une agression d'allergènes, virus ou irritants non spécifiques. Elle devient alors œdémateuse et infiltrée par des cellules inflammatoires libérant des cytokines (qui activent et attirent d'autres cellules inflammatoires) et des médiateurs comme l'histamine ou les leucotriènes (qui contractent le muscle lisse bronchique). (Bellaïche et Pham 2017).

Il existe de plus le terrain allergique qui aggrave le phénomène. En effet, la dégranulation des mastocytes stimulés par l'allergène, libère également les médiateurs précités. Le mécanisme déclenchant est le plus souvent l'infection virale chez le petit enfant et l'exposition à un allergène chez le grand enfant ou l'adolescent. (Bellaïche et Pham 2017).

L'asthme fait partie de la « marche atopique » : allergie alimentaire puis eczéma puis asthme puis rhinite allergique. (Bellaïche et Pham 2017) .

1.1.4. Pathogénèse de l'asthme allergique

1.1.4.1. L'inflammation des voies aériennes

L'inflammation des voies respiratoires dans l'asthme est un processus multicellulaire impliquant principalement les éosinophiles, les neutrophiles, les Lymphocytes CD4 +(LT CD4+) et mastocytes, avec infiltration éosinophile

Une caractéristique fondamentale de l'asthme, la sensibilisation qui est la capacité des voies respiratoires à reconnaître l'allergène et générer une réponse de lymphocytes auxiliaires 2 (Th2), mécanisme qui débute par l'absorption et le traitement des allergènes inhalés par les cellules dendritiques situées dans l'épithélium et la sous-muqueuse des voies respiratoires. L'absorption d'allergène est renforcée par les immunoglobuline E (IgE) liées aux récepteurs

de haute affinité sur les cellules dendritiques qui facilitent l'internalisation des allergènes. (Holgate 2008)

Une fois que la cellule dendritique a engagé l'allergène, elle reçoit des signaux pour migrer vers les collections lymphoïdes locales où la présentation de l'antigène a lieu. Ses récepteurs de chimiokines spécifiques, dont récepteur de chimokine c-c (CCR7) et ses ligands CCL19 et CCL21 (et dans une moindre mesure CXCR4 et son ligand CXCL12), sont impliqués dans cette migration chimiotactique pour permettre le contact avec les lymphocytes T naïfs. La présentation d'un peptide antigénique sélectionné au récepteur des cellules T déclenche la sensibilisation et la réponse immunitaire subséquente à l'allergène spécifique. La nature de cette réponse immunitaire dépend de l'engagement de molécules costimulatrices sélectives qui se produit en parallèle. Pour une activation efficace des cellules T dépendante de l'antigène, l'engagement de cluster de différenciation (CD80) (B7.1) ou CD86 (B7.2) sur les cellules dendritiques avec CD28 sur les cellules T conduit à une sensibilisation. (figure 1.1) (Holgate 2008).

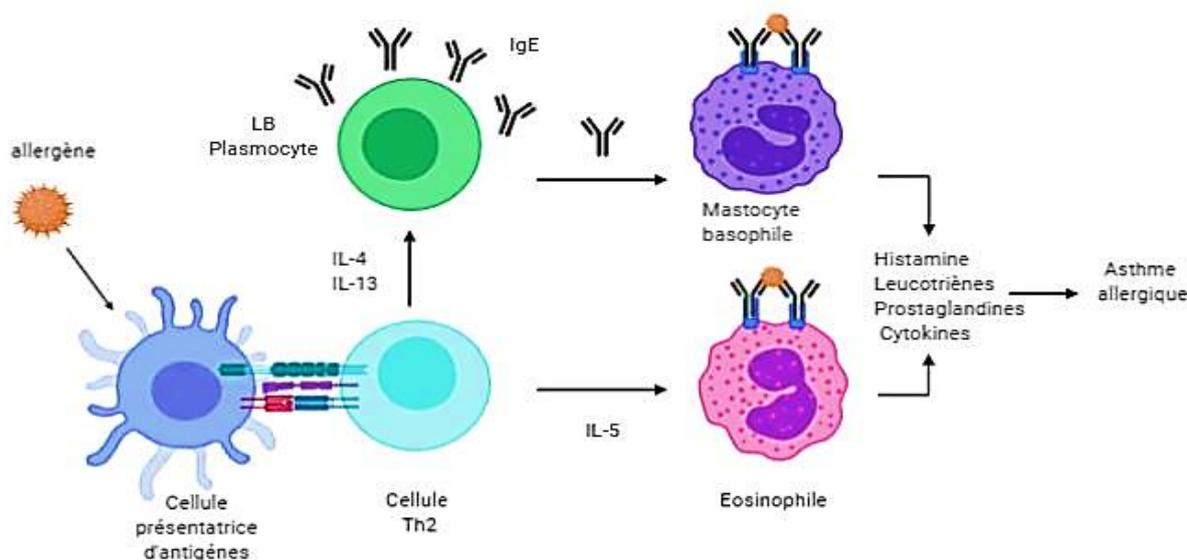


Figure 1.1. Représentation schématique de la cascade d'inflammation dans l'asthme allergique (Holgate, 2008). Interleukine (IL-4, IL-13, IL-5), Lymphocyte auxiliaire (Th2), Lymphocyte B (LB), Immunoglobuline E (IgE).

1.1.4.2 Effecteurs de la réponse inflammatoire

L'inflammation des voies aériennes observée dans l'asthme reflète un déséquilibre dans les interactions via des cibles et des effecteurs multiples, entre les cellules inflammatoires, l'épithélium bronchique et la réponse immunitaire de l'hôte.

1.1.4.2.1. Les mastocytes

Jouent un rôle majeur dans la phase aiguë du processus inflammatoire dans l'asthme : la fixation des antigènes sur le récepteur FCR1 via les IgE spécifiques conduit à leur activation et la libération de médiateurs inflammatoires, dont l'histamine, directement impliquée dans la contraction du muscle lisse bronchique et l'augmentation de la perméabilité vasculaire. Elles contribuent également à la production de facteur de nécrose tumorale (TNF) et donc au recrutement des neutrophiles, des cellules dendritiques et des LT CD4+. (Létuvé et Taillé 2013)

1.1.4.2.2. Les basophiles

Les basophiles comme les mastocytes, participent à l'initiation de l'inflammation allergique, par l'intermédiaire de la fixation des IgE spécifiques sur le récepteur FCR1. Ils sont également impliqués dans la différenciation Th2 des lymphocytes T, via leur sécrétion d'IL-4 mais aussi en établissant des contacts cellulaires directs dans les ganglions lymphatiques. La production d'IL-4 et d'IL-6 par les basophiles contribue de plus à la réponse humorale aux stimulations antigéniques répétées, en favorisant la prolifération des lymphocytes B et la production des anticorps (Létuvé et Taillé 2013).

1.1.4.2.3. Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques jouent donc un rôle essentiel dans la communication entre immunité innée et immunité adaptative, et participent à la polarisation de la réponse induite par l'antigène. Les cellules dendritiques sont présentes en nombre plus important dans les bronches d'asthmatiques et expriment des marqueurs d'activation. Elles constituent le « réseau sentinelle » de la muqueuse bronchique et sont capables de capturer les aéroallergènes grâce à des extensions cellulaires situées en surface de l'épithélium. Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes, capables de migrer rapidement dans les ganglions lymphatiques, ce qui leur confère un rôle majeur dans l'initiation de la réponse locale aux antigènes inhalés, et notamment dans la différenciation Th2 des LT CD4+ activés.

La synthèse de chimiokines par les cellules dendritiques permet de plus le recrutement ciblé des cellules de l'immunité vers le site d'entrée de l'allergène, facilité par l'augmentation locale de la perméabilité vasculaire. (Létuvé et Taillé 2013).

1.1.4.2.4. Éosinophiles

La présence d'éosinophiles dans les voies aériennes est un des éléments les plus caractéristiques de l'asthme, mais qui n'est pas retrouvé chez tous les patients. Le nombre d'éosinophiles dans les voies aériennes des patients asthmatiques corrèle cependant avec la sévérité de la maladie. La différenciation et le recrutement de ces granulocytes au niveau des bronches dépendent de façon critique de la présence d'IL-5. Leur activation conduit à la sécrétion de protéines cationiques spécifiques, la protéine basique majeure (MBP), protéine cationique des éosinophiles (ECP), peroxidase d'éosinophile (EPO) et la neurotoxine dérivée des éosinophiles (EDN). De par leurs propriétés cytotoxiques, ces médiateurs ont ainsi été impliqués dans l'altération de la cohésion de l'épithélium bronchique. Certaines cytokines produites par les éosinophiles favorisent leur propre survie (IL-5) et recrutement (éotaxine et regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted) dans les bronches. (Létuvé et Taillé 2013).

1.1.4.2.5. Lymphocytes

On a longtemps pensé que l'anomalie princeps qui conduit à l'asthme résidait dans un déséquilibre entre les réponses des lymphocytes auxiliaire Th1 et Th2. Cependant, dans les modèles animaux d'asthme allergique, les lymphocytes Th1 ne sont ainsi pas toujours protecteurs et l'interféron (IFN), cytokine Th1, est également produit au cours de la sensibilisation allergique. La découverte du rôle des sous-populations lymphocytaires Th17, lymphocytes régulateur (Treg) et tueur naturel (NK) -T démontre à présent que le paradigme Th1 / Th2 ne peut à lui seul rendre compte de la complexité de la réponse inflammatoire dans l'asthme. (Létuvé et Taillé 2013)

1.1.5 Les facteurs de risque de l'asthme

1.1.5.1 Liaison gastro-intestinale et respiratoire : Microbiome intestinal

Le lien entre le microbiome intestinal et divers états pathologiques, y compris l'asthme et les maladies allergiques, a été facilement exploré. L'exposition aux micro-organismes environnementaux divers, en particulier au début de la vie, peut aider à la prévention de la maladie atopique. .

L'exposition à des niveaux élevés et diversifié groupe de micro-organismes entraîne une activation accrue de la système immunitaire inné, conduisant probablement à la génération de cellules T régulatrices et à la promotion de tolérance. Il a également été postulé qu'une

exposition précoce entraîne des changements dans les cellules NK . (Heederik et von Mutius 2012) .

D'après des études les chercheurs ont démontré que les souris exemptes de germes avaient une accumulation de cellules NK invariante, entraînant probablement une inflammation accrue et des réponses des voies aériennes aux allergènes plus élevées que leurs homologues . (Heederik et von Mutius 2012).

Il est maintenant bien étudié que les enfants européens vivant à la ferme ont des taux d'asthme plus faibles, probablement en raison de l'exposition accrue à divers micro-organismes .

- Inhalation a été proposé comme principal mécanisme d'exposition, mais une exposition par voie orale peut également entraîner une diversité du microbiome, comme le suggère une diminution du risque de maladies atopiques chez les consommateurs du lait non pasteurisé .

Cependant, d'autres études ont montré que

- les expositions précoces dans les communautés non agricoles peut également avoir des effets protecteurs sur le développement de la maladie atopique. Pour ces communautés, les expositions peuvent se produire par animaux de compagnie et contact humain. C'est peut-être pourquoi la présence de les frères et sœurs et les animaux domestiques à la maison sont également associés à une diminution du risque de maladie .

Étant donné que les expositions précoces peuvent aider à maintenir la diversité du microbiome, d'autres expositions au début de la vie peuvent entraîner des dysbiose. Par exemple

- l'administration d'antibiotiques peut entraîner changements à long terme dans le microbiome intestinal. Ça a été montré que les antibiotiques intrapartum pendant la césarienne et l'accouchement vaginal a entraîné des changements dans les micro-organismes gastro-intestinaux qui ont persisté jusqu'à 12 mois après la naissance . Des changements prolongés ont été observés principalement chez les nourrissons qui ont accouché par césarienne et ceux qui ont été nourris au lait maternisé. En outre l'exposition aux antibiotiques, d'autres facteurs durant la petite enfance affectent le microbiome du nourrisson et ont été associés de façon variable au développement d'asthme et d'allergies, notamment l'allaitement maternel vs allaitement et mode d'administration (par exemple, césarienne section vs accouchement vaginal) . (Heederik et von Mutius 2012) .

1.1.5.2. Exposition à la fumée du tabac

Il a été bien établi que le tabagisme maternel pendant la grossesse et l'enfance augmente le risque d'épisodes de sifflements et d'asthme chez les enfants. Des études plus récentes ont également suggéré que le tabagisme paternel pendant la grossesse peut affecter le développement des poumons du fœtus et augmenter leur risque d'asthme.(Harju et *al.* 2016).

1.1.5.3. Le stress et l'asthme

Le stress prénatal et au début de la vie et les corrélats de stress (anxiété maternelle ou la dépression) augmentent le risque de troubles respiratoires infantiles.(Rosa, Lee, et Wright 2018).

1.1.5.4. Carence en vitamine D

La carence en vitamine D joue un rôle dans la sévérité des symptômes de la pathologie.

La vitamine D et l'activation de son récepteur ont des propriétés immunomodulatrices et anti-inflammatoires. Grâce à ce récepteur, la vitamine D peut atténuer les effets à la fois de la réponse immunitaire innées et les réponses adaptatives en agissant sur les cellules dendritiques (DC), les macrophages, lymphocytes B et lymphocytes T (LT, LB). Figure1.2(Hall et Agrawal 2017).

La vitamine D peut également jouer un rôle dans

- le remodelage des voies aériennes, par des changements sur les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires et la transcription de guidage des cytokines pro-inflammatoires. (Stern, Pier, et Litonjua 2020).
- inhibition de la prolifération des muscles lisses (l'inhibition de la prolifération des cellules dans l'asthme ce fait en empêchant la progression du cycle cellulaire, non en induisant l'apoptose).(Gupta et *al.* 2011).

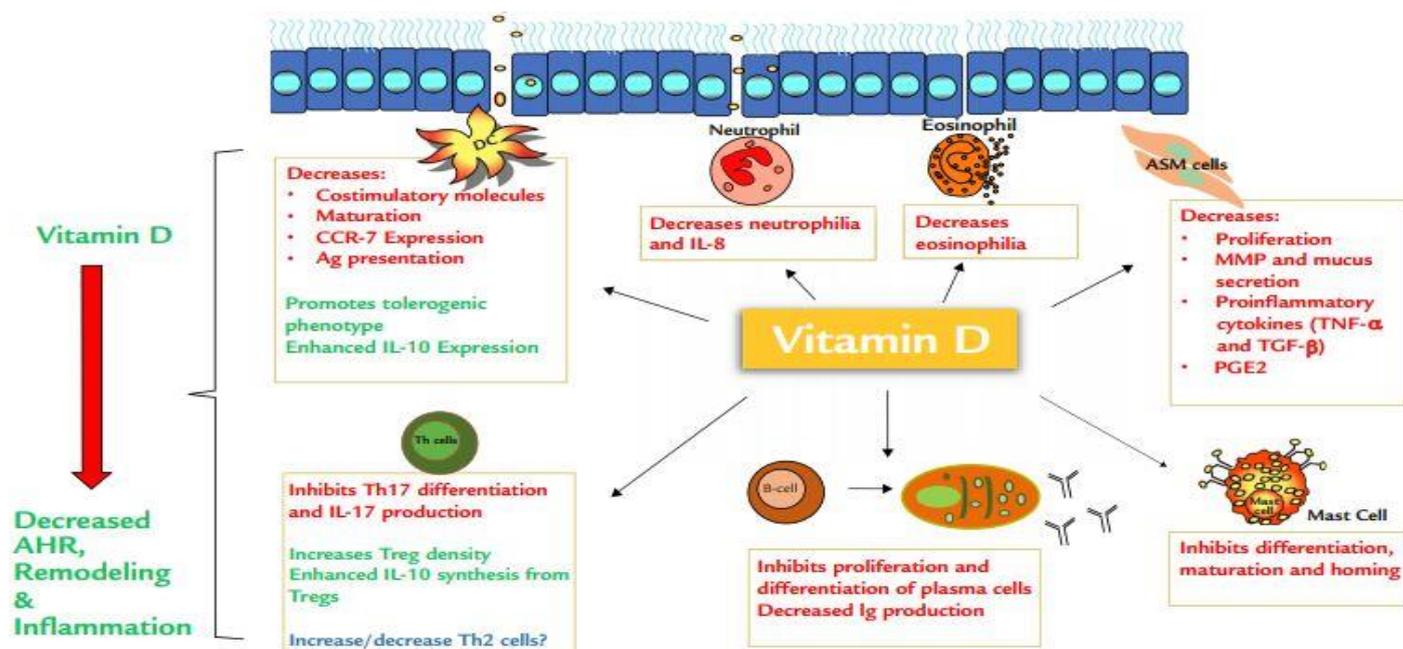


Figure 1.2. Effets immunomodulateurs de la vitamine D sur les cellules inflammatoires dans l'asthme allergique (Hall et Agrawal 2017)

D'après des études faite sur des modèles d'animaux, une carence en vitamine D a entraîné augmentation du remodelage des voies respiratoires, augmentation de l'éosinophilie lors du lavage bronchique, réduction des cellules T régulatrices, augmentation de l'expression facteur nucléaire-kappa B (NF-KB) et augmentation des cytokines pro-inflammatoires (Stern, Pier, et Litonjua 2020) .

De plus, de faibles niveaux maternels de vitamine D pendant la grossesse a été associée à une incidence accrue de respiration sifflante chez les enfants. Des études animales ont montré que la vitamine D joue un rôle dans le développement pulmonaire foetal. (Stern, Pier, et Litonjua 2020) .

Evidemment, la vitamine D a été démontré qu'elle module les cellules alvéolaires de type II (ATII) et les lipofibroblastes, prolifération et différenciation, deux étapes critiques de la maturation l'alvéolaire. De plus elle favorisent les interactions épithéliales-mésenchymateuses alvéolaires dans le temps et l'espace, l'accélération de la maturation alvéolaire et l'amélioration de la fonction pulmonaire. Figure 1.3 (Yurt et *al.* 2014).

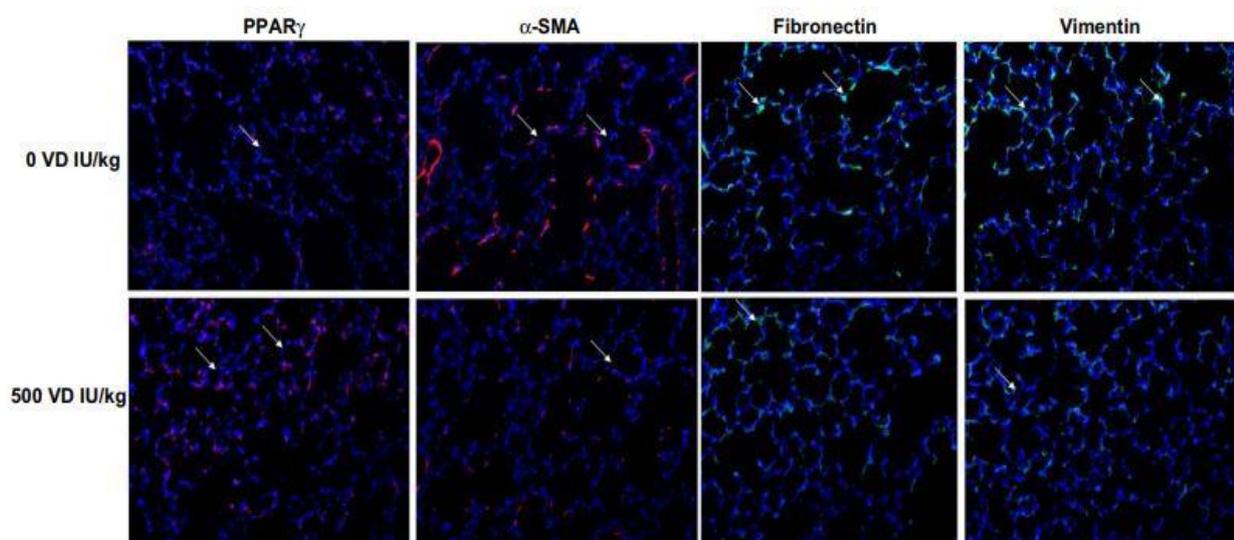


Figure 1.3. Effet de la déficience périnatale VD sur les marqueurs mésenchymateux de la différenciation alvéolaire (Yurt et al. 2014) Diminution de la différenciation lipofibroblastique (PPAR, rouge fluorescence) et augmentation de la différenciation myogénique [α -actine des muscles lisses (SMA), fluorescence rouge; calponine, fluorescence verte; et vimentine, verte fluorescence] dans le groupe déficient en VD, par rapport au groupe supplémenté en cholécalférol à 500 UI / kg, ont également été confirmés par immunocoloration sur le poumon sections de ces conditions (des taches d'immunocoloration représentatives sont montrées)

Une carence altère la signalisation homéostatique dans le poumon en développement, entraînant des modifications structurelles et fonctionnelles pulmonaires altérées (Yurt et al. 2014) .

Pour conclure il est possible qu'un défaut structurel de développement de la paroi des voies respiratoires chez les enfants résulte d'une carence en vitamine D in utero, et qui peut avoir conduit à l'asthme en premier lieu.

1.1.6. Symptômes et diagnostic

1.1.6.1. Le diagnostic initial

Le diagnostic de l'asthme est basé sur l'identification à la fois d'un schéma caractéristique des Symptômes respiratoires tels que respiration sifflante, essoufflement (dyspnée), oppression thoracique ou toux, et variables limitation du débit d'air expiratoire. La configuration des symptômes est importante, car les symptômes respiratoires peuvent être dus à des conditions chroniques autres que l'asthme. Si possible, les preuves étayant un diagnostic d'asthme doivent être documentée lorsque le patient se présente pour la première fois, car les caractéristiques de l'asthme peuvent s'améliorer spontanément ou avec

traitement; en conséquence, il est souvent plus difficile de confirmer un diagnostic d'asthme une fois que le patient a commencé le traitement .Tableau 1.1 (Global Initiative for Asthma 2020).

Modèles de symptômes respiratoires caractéristiques de l'asthme

Les caractéristiques suivantes sont typiques de l'asthme et, si elles sont présentes, augmentent la probabilité que le patient souffre d'asthme: Symptômes respiratoires: respiration sifflante, essoufflement, toux et / ou oppression thoracique.

:• Les patients (en particulier les adultes) éprouvent plus d'un de ces types de symptômes.

- Les symptômes sont souvent pires la nuit ou tôt le matin.

- Les symptômes varient dans le temps et en intensité.

- Les symptômes sont déclenchés par des infections virales (rhumes), de l'exercice, une exposition aux allergènes, des changements de temps, des rires ou aux irritants tels que les gaz d'échappement des voitures, la fumée ou les odeurs fortes. Les caractéristiques suivantes diminuent la probabilité que les symptômes respiratoires soient dus à l'asthme:

- Toux isolée sans autre symptôme respiratoire .

- Production chronique de crachats.

- Essoufflement associé à des étourdissements, des étourdissements ou des picotements périphériques (paresthésie).

- Douleur thoracique.

- Dyspnée induite par l'exercice avec une inspiration bruyante.

(Global Initiative for Asthma 2020)

Tableau 1.1. Critères de diagnostic de l'asthme chez l'adulte, adolescents, enfants 6-11ans)(Global Initiative for Asthma 2020)

fonction de diagnostic	critères de diagnostic de l'asthme
1. Antécédents de symptômes respiratoires variables	
<p>Respiration sifflante, essoufflement, poitrine oppression et toux</p> <p>Les description peut varier selon les cultures et par âge, par exemple les enfants peuvent être décrits comme avoir une respiration lourde</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Généralement plus d'un type de symptôme respiratoire (chez l'adulte, la toux isolée est rarement due à l'asthme) • Les symptômes surviennent de façon variable dans le temps et varient en intensité • Les symptômes sont souvent pires la nuit ou au réveil • Les symptômes sont souvent déclenchés par l'exercice, le rire, les allergènes, l'air froid • Les symptômes apparaissent ou s'aggravent souvent avec des infections virales
2. Limitation confirmée variable du débit d'air expiratoire	
Variabilité excessive des fonctions documentées des poumons *(un ou plusieurs des tests ci-dessous)	Plus les variations sont importantes ou plus les variations excessives sont fréquentes , plus le diagnostic est sûr
ET imitation documentée du flux d'air expiratoire	<p>À un moment où FEV 1 est réduit, vérifiez que FEV 1 / FVC est réduit (il est généralement</p> <ul style="list-style-type: none"> • chez l'adulte > 0,75–0,80 • chez l'enfant > 0,90
test de réversibilité positive aux bronchodilatateurs (plus susceptible d'être positif si le médicament est suspendu avant le test: SABA≥4 heures, LABA ≥15 heures)	<p>Adultes : augmentation de la FEV 1 de > 12% et > 200 mL de base, 10 à 15minutes après 200–400 mcg de salbutamol (albuterol) ou équivalent (plus de confiance si l'augmentation est> 15% et> 400 ml).</p> <p>Enfants : augmentation FEV 1 > 12% prévu</p>
Variabilité excessive du PEF deux fois par jour plus de 2 semaines	<p>Adultes : variabilité journalière moyenne du PEF diurne> 10%</p> <p>Enfants : variabilité diurne moyenne du PEF journalier> 13%</p>

Augmentation significative de la fonction pulmonaire après 4 semaines de traitement anti-inflammatoire	Adultes : augmentation de la FEV ₁ par > 12% et > 200 ml (ou PEF ↑ par > 20%) de ligne de base après 4 semaines de traitement, en dehors des infections respiratoires
Test d'épreuve d'effort positif	Adultes : baisse FEV ₁ > 10% et > 200 ml de base Enfants : chute du VEMS ₁ de > 12% prévue ou du PEF > 15%
Test de provocation bronchique positif (généralement réalisée uniquement chez l'adulte)	Chute du VEMS ₁ par rapport à la valeur initiale ≥ 20% avec des doses standard de méthacholine ou histamine, ou ≥ 15% avec hyperventilation standardisée, solution saline, hypertonique ou mannitol
Variation excessive de la fonction pulmonaire entre les visites (bonne spécificité mais faible sensibilité)	Adultes : variation de FEV ₁ de > 12% et > 200 mL entre les visites, en dehors des infections respiratoires Enfants : variation du FEV ₁ de > 12% dans le FEV ₁ ou > 15% dans le PEF entre visites (peuvent inclure des infections respiratoires)

1.1.6.2. Diagnostic clinique de l'asthme chez le jeune enfant

Il peut être difficile de faire un diagnostic de l'asthme chez les enfants de 5 ans et moins, les symptômes respiratoires sont épisodique tels que la respiration sifflante et la toux sont également fréquents chez les enfants sans asthme, en particulier chez les 0–2 ans, et il n'est pas possible d'évaluer systématiquement la limitation du débit d'air ou la réactivité aux bronchodilatateurs à ce groupe âge. Une approche basée sur les probabilités, et sur le schéma des symptômes pendant et entre les infections virales des voies respiratoires, peut être utile pour la discussion avec les parents / tuteurs. Cela permet de prendre des décisions individu sur l'opportunité de donner un essai de traitement. Il est important de prendre des décisions pour chaque enfant individuellement, pour éviter sur ou sous traitement. (Global Initiative for Asthma 2020).

1.1.6.3. Symptômes évocateurs d'asthme chez les enfants de 5 ans et moins

Un diagnostic d'asthme chez les enfants de 5 ans et moins peuvent souvent être basés sur Figure 1.2 :

Chapitre 1. Revue de la littérature

- Modèles de symptômes (limitation d'épisodes récurrents de respiration sifflante, de toux, d'essoufflement), et des symptômes ou des réveils nocturnes).
- Présence de facteurs de risque de développement de l'asthme, tels que des antécédents familiaux d'atopie, de sensibilisation allergique, d'allergie ou d'asthme, ou des antécédents personnels d'allergie alimentaire ou de dermatite atopique.
- Réponse thérapeutique au traitement du contrôleur.
- Exclusion de diagnostics alternatifs .

Figure1.2. Caractéristiques suggérant un diagnostic d'asthme chez les enfants de 5 ans et moins (Global Initiative for Asthma 2020)

Fonctionnalité	Caractéristique suggérant l'asthme
Toux	-Toux non productif récurrente ou persistante qui peut être pire la nuit ou accompagnée de respiration sifflante et de difficultés respiratoires. -Toux survenant avec l'exercice, le rire, les pleurs ou l'exposition au tabac fumée, en particulier en l'absence d'une infection respiratoire apparente
Respiration sifflante	-Respiration sifflante récurrente, y compris pendant le sommeil ou avec des déclencheurs tels que l'activité, rire, pleurer ou être exposé à la fumée de tabac ou à la pollution de l'air
Respiration difficile ou lourde	-Se produire avec de l'exercice, rire ou pleurer
essoufflement	Ne pas courir, jouer ou rire à la même intensité que les autres enfants; pneus plus tôt pendant les promenades (veut être transporté)
Activité réduite	-Autre maladie allergique (dermatite atopique ou rhinite allergique, allergie alimentaire). -Asthme chez les parents au premier degré
Essai thérapeutique avec inhalation à faible dose de corticostéroïde (ICS) , et au besoin SABA	-Amélioration clinique pendant 2 à 3 mois de traitement de contrôle et aggravation à l'arrêt du traitement.

- Essais pour aider au diagnostic

Bien qu'aucun test ne diagnostique avec certitude et définitivement l'asthme avec certitude, chez les enfants de 5 ans et moins, les sont des compléments utiles.

- Essai thérapeutique

Un essai de traitement pendant au moins 2 à 3 mois avec un bêta-2 (SABA) à courte durée d'action au besoin et une faible dose régulière des corticostéroïdes inhalés (SCI) peuvent fournir des indications sur le diagnostic de l'asthme. La réponse devrait être évaluée par le contrôle des symptômes (de jour et de nuit) et la fréquence des épisodes de respiration sifflante et des exacerbations.

Une amélioration clinique marquée pendant le traitement et une détérioration à l'arrêt du traitement soutiennent un diagnostic de asthme. En raison de la nature variable de l'asthme chez les jeunes enfants, un essai thérapeutique peut devoir être répété afin d'être certain du diagnostic.

- Tests de sensibilisation allergique

La sensibilisation aux allergènes peut être évaluée à l'aide de tests cutanés ou IgE spécifiques aux allergènes.

la sensibilisation allergique est présente chez la majorité des enfants asthmatiques une fois qu'ils ont plus de 3 ans; cependant, l'absence de la sensibilisation aux aéroallergènes courants n'exclut pas un diagnostic d'asthme. La sensibilisation allergique est la meilleure prédicteur du développement de l'asthme persistant.

- Radiographie pulmonaire

Les radiographies sont rarement indiquées; cependant, en cas de doute sur le diagnostic d'asthme dans une respiration sifflante ou une toux une radiographie thoracique simple peut aider à exclure des anomalies structurelles (par exemple emphysème lobaire congénital, anneau vasculaire) infections chroniques telles que la tuberculose, un corps étranger inhalé ou d'autres diagnostics. D'autres investigations d'imagerie peuvent être approprié, selon la condition considérée.

- Test de fonction pulmonaire

En raison de l'incapacité de la plupart des enfants de 5 ans et moins à effectuer des manœuvres expiratoires reproductibles, la fonction pulmonaire les tests, les tests de provocation bronchique et d'autres tests physiologiques n'ont pas un rôle majeur dans le diagnostic de l'asthme à cet âge. Cependant, à 5 ans, de nombreux enfants sont capables d'effectuer une spirométrie reproductible s'ils sont un technicien expérimenté et avec des incitations visuelles.

(Global Initiative for Asthma 2020)

1.1.7. Traitement

- Le traitement par CSI quotidien à faible dose, avec Le salbutamol (SABA) au besoin, est très efficace pour réduire les symptômes de l'asthme et réduire le risque d'exacerbations liées à l'asthme, d'hospitalisation et de décès, mais l'adhésion au SCI est médiocre.
- Chez l'adulte et l'adolescent souffrant d'asthme léger, un traitement par CSI-formotérol à faible dose au besoin réduit le risque de sévères exacerbations d'environ deux tiers par rapport au traitement SABA uniquement, et non inférieure à la faible dose quotidienne CSI pour les exacerbations sévères. Intensification si l'asthme reste incontrôlé malgré une bonne adhérence et une bonne technique d'inhalation.
- Pour les patients présentant des symptômes persistants et / ou des exacerbations malgré une faible dose de CSI, envisagez d'intensifier mais vérifiez d'abord pour des problèmes courants tels que la technique des inhalateurs, l'observance, l'exposition persistante aux allergènes et les comorbidités.
- Pour les adultes et les adolescents, le pas en avant préféré consiste à associer un bêta- 2 agoniste (SABA) à faible dose et à longue durée d'action du CSI .
- Pour les adultes et les adolescents souffrant d'exacerbations malgré d'autres thérapies, le risque d'exacerbations est réduit avec combinaison CSI-formotérol à faible dose (avec béclométasone ou budésonide) pour l'entretien et le soulagement, maintenance SABA selon les besoins.
- Pour les enfants de 6 à 11 ans, les options de l'étape 3 comprennent un CSI à dose moyenne et une combinaison CSI-SABA à faible dose, comme thérapie d'entretien avec SABA au besoin.

(Global Initiative for Asthma 2020)

1.1.7.1. Médicaments pour les asthmatiques

Catégories de médicaments contre l'asthme

Par rapport aux médicaments utilisés pour d'autres maladies chroniques, la plupart des médicaments utilisés pour l'asthme a des ratios thérapeutiques très favorables .

Les options pharmacologiques à long terme le traitement de l'asthme se divise en trois grandes catégories :

- Médicaments de contrôle : ils sont utilisés pour réduire l'inflammation des voies respiratoires, contrôler les symptômes et réduire les risques futurs telles que les

exacerbations et le déclin de la fonction pulmonaire. Chez les patients souffrant d'asthme léger, un traitement de contrôle peut être administré par le biais d'CSI-formotérol à faible dose selon les besoins, pris lorsque les symptômes surviennent et avant l'exercice.

- Médicaments de secours (de secours) : ils sont fournis à tous les patients pour soulager au besoin les symptômes révolutionnaires, y compris lors de l'aggravation de l'asthme ou d'exacerbations. Ils sont également recommandés pour la prévention à court terme des broncho constriction induite par l'exercice. Réduire et, idéalement, éliminer le besoin de soulagement SABA est à la fois un objectif important dans la gestion de l'asthme et une mesure du succès du traitement de l'asthme.
- Thérapies complémentaires pour les patients souffrant d'asthme sévère elles peuvent être envisagées lorsque les patients présentent des symptômes persistants et / ou des exacerbations malgré un traitement optimisé avec des médicaments à forte dose (généralement une dose élevée d'CSI plus un SABA) et le traitement des facteurs de risque modifiables.

(Global Initiative for Asthma 2020)

1.1.7.3. Étapes du traitement de l'asthme pour les enfants de 5ans et plus jeunes

- Bêta2-agoniste à courte durée d'action inhalé (SABA) selon les besoins

Tous les enfants qui éprouvent des épisodes de respiration sifflante devraient recevoir du SABA inhalé pour soulager les symptômes , bien qu'il ne soit pas efficace chez tous les enfants.

L'utilisation de SABA pour le soulagement des symptômes en moyenne plus de deux fois par semaine sur une période d'un mois indique la nécessité d'un essai du médicament contrôleur. Le traitement par bronchodilatateur oral n'est pas recommandé en raison de son début d'action plus lent et de son taux plus élevé d'effets secondaires par rapport au SABA inhalé .

- CSI quotidien à faible dose et SABA au besoin

Un CSI quotidien à faible dose est recommandé comme traitement initial préféré pour contrôler l'asthme enfants de 5 ans et moins . Ce traitement initial doit être administré pendant au moins 3 mois à établir son efficacité dans la réalisation d'un bon contrôle de l'asthme.

(Global Initiative for Asthma 2020)

1.1.7.4. Conseils provisoires sur la gestion de l'asthme pendant la Pandémie de covid19

Conseiller aux patients asthmatiques de continuer à prendre leurs médicaments contre l'asthme prescrits, en particulier par inhalation corticostéroïdes (CSI) contenant des

médicaments et corticostéroïdes oraux (CSO) si prescrits Il est important que les patients continuent de prendre leurs médicaments contre l'asthme comme d'habitude pendant le COVID-19 (maladie des coronavirus 2019) pandémie. Cela comprend les médicaments contenant du SCI (seuls ou en combinaison avec un agissant bêta- 2 agissant (SABA)) et thérapie complémentaire, y compris la thérapie biologique pour l'asthme sévère. Arrêter CSI conduit souvent à une aggravation potentiellement dangereuse de l'asthme. (Global Initiative for Asthma 2020)

1.1.8. La prévention contre l'asthme pédiatrique

Les parents demandent comment réduire le risque de développement d'asthme chez les enfants. Le facteur peut-être le plus important est la nécessité de fournir un environnement positif et favorable à la discussion qui diminue le stress et encourage les familles à faire des choix avec lesquels elles se sentent à l'aise.

- Les enfants ne doivent pas être exposés à la fumée de tabac ambiante pendant la grossesse ou après la naissance.
- .L'accouchement vaginal doit être encouragé dans la mesure du possible.
- L'allaitement maternel est conseillé pour des raisons autres que la prévention des allergies et de l'asthme.
- L'utilisation d'antibiotiques à large spectre pendant la première année de vie doit être découragée.

(Global Initiative for Asthma 2020)

1.2. La Vitamine D

1.2.1 Origine

La vitamine D est une vitamine liposoluble et une hormone en raison de la grande variété de ses effets systémiques extra- osseux au niveau de nombreuses cibles comme le tube digestif, les reins, et le système immunitaire. Elle agit au niveau de la plupart des tissus de l'organisme et régule plus de 200 gènes.

Chapitre 1. Revue de la littérature

Elle peut être d'origine exogène (alimentaire) ou endogène (secondaire à l'exposition solaire). La vitamine D2 (ergocalciférol) est d'origine végétale et la vitamine D3 (cholécalfiérol) est d'origine animale. (Figure 1.2.) (Dutau et Lavaud 2012), qu'elle soit d'origine alimentaire ou endogène, la vitamine D n'est pas biologiquement active. C'est une prohormone, transportée dans le sang par une protéine de liaison : la protéine de liaison à la vitamine D (DBP). (Dutau et Lavaud 2012)

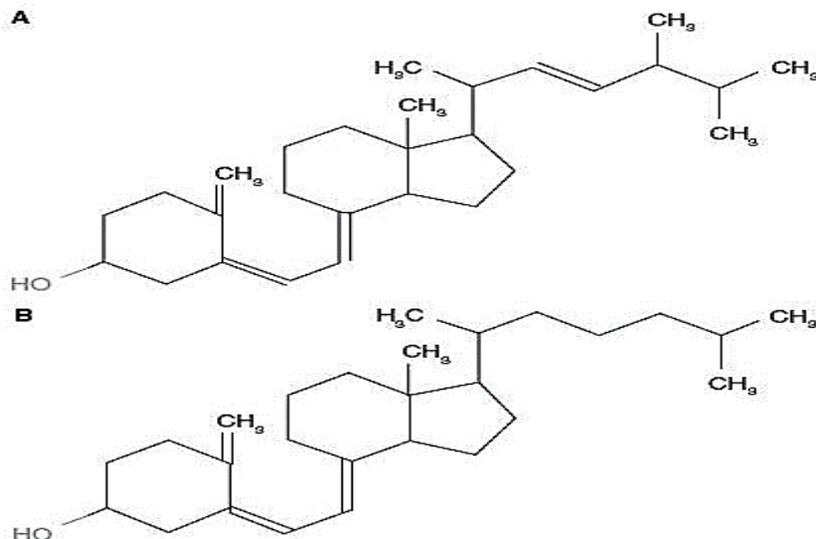


Figure 1.4. Vitamine D2 ou ergocalciférol (A) et vitamine D3 ou cholécalfiérol (B).(Dutau and Lavaud, 2012).

— la vitamine D joue un rôle prépondérant dans le métabolisme phosphocalcique : absorption intestinale du calcium et fixation du calcium dans l'os. (Tableau 1.1)

— la vitamine D aurait également d'autres effets : prévention dans le développement de certaines maladies infectieuses et allergiques, de certaines maladies autoimmunes ou à composante autoimmune (La sclérose en plaques (SEP), diabète de type 1, polyarthrite rhumatoïde et lupus), du syndrome métabolique.

Tableau 1.3. Tableau Principaux sites de stockage de la vitamine D (Landrier, 2014)

	VITAMINE D (UI)	25(OH)D (UI)	TOTAL (UI)
TISSU ADIPEUX	6960	1763	8723
MUSCLE	1527	1055	2581
FOIS	168	214	382
SERUM	271	1559	1830
AUTRE	571	578	1149
TOTAL	9496	5169	14665

— le statut vitaminique D d'un individu est défini par la mesure de la 25(OH)D sérique, en accord avec l'ensemble de la communauté scientifique internationale.

— le taux de 25OHD sérique doit être supérieur à 75 nmol/L (ou 30 ng/ml) pour admettre un statut vitaminique normal et ne pas dépasser 200nmol/L, selon la majorité des auteurs (Tableau 1.2) (Landrier 2014)

Tableau 1.4. Tableau Apports nutritionnels recommandés (ANC) (Landrier, 2014)

TRANCHE D'AGE	ANC UG/JOUR	ANC UI/JOUR
ENFANTS (1 A 3 ANS)	10	400
ENFANTS (4 A 12 ANS)	5	200
ADOLESCENTS (13 A 19 ANS)	5	200

1.2.3. Vitamine D3 et système immunitaire

Le rôle potentiel de la vitamine D3 et de son métabolite actif 1,25 (OH)₂ D3 dans la modulation de la réponse immunitaire a longtemps été reconnu depuis la découverte des récepteurs de la vitamine D (VDR) dans les macrophages, les CD et les LT (Adorini 2005). La totalité de la réponse immunitaire implique les deux types de réponses (innée et adaptative) dans des interactions complexes faisant intervenir de nombreuses cytokines (Pedersen, Claesson, et Zocca 2011).

1.2.3.1 Vitamine D3 et Immunité innée

Les cellules actrices de cette réponse immunitaire sont les monocytes, les macrophages, les DC et NK) ainsi qu'un certain nombre d'autres cellules. Dans les monocytes et les macrophages, l'interféron gamma (IFN- γ) ou le lipopolysaccharide (LPS de ligand TLR4) favorisent la conversion de la 25 (OH) D3 en 1,25 (OH) $_2$ D3 (Hewison 2011). Cette dernière (1,25 (OH) $_2$ D3) stimule les récepteurs TLR (Toll- Like Receptors) présents à la surface des cellules immunitaires afin de reconnaître des motifs associés aux pathogènes (PAMP) (Viard 2015) pour le détruire. De plus, dans des conditions de stimulations, les monocytes et les macrophages expriment de faibles niveaux de L'enzyme catabolique de la vitamine D3 (CYP24A1) (Bikle 2011). La vitamine D3 agit donc dans ce cas non seulement par une action endocrine, mais aussi par effet intracrine. Ce système subit un rétrocontrôle négatif qui permet d'éviter un état inflammatoire trop important. Ainsi, le calcitriol inhibe les TLR après leur activation et le début de la réaction (Viard 2015). La 1,25 (OH) $_2$ D3 diminue la maturation des DC, l'inhibition de la régulation positive de l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII), CD40, CD80 et CD86. De plus, elle diminue la production d'IL-12 par des DC tout en induisant la production d'IL-10 (Gauzzi *et al.* 2005).

1.2.3.2. Vitamine D3 et Immunité adaptative

A la différence de l'immunité innée, l'immunité adaptative est lente à se mettre en place.

Les cellules qui y sont mises en jeu sont, d'une part, les LT (effecteurs et régulateurs) (Kroner, Sommer, et Fabri 2015) et, d'autre part, les LB (Lang *et al.*, 2013). Parmi les lymphocytes T effecteurs, on trouve :

- les Th1, qui synthétisent IL-2, le TNF et IFN, à réponse cellulaire.
- les Th2, qui synthétisent l'IL-3, l'IL-4, IL-5 et l'IL-10, à réponse humorale.
- les Th17, qui synthétisent l'IL-17 et l'IL-6, impliqués dans la régulation des maladies autoimmunes.

Les lymphocytes T régulateurs secrètent l'IL-10, la cytokine anti-inflammatoire, et en régulant la réponse induite par les lymphocytes T effecteurs, permettent d'empêcher les inflammations excessives (Gil *et al.*, 2018).

La vitamine D3 inhibe les lymphocytes Th1 et Th17 mais favorise les lymphocytes T régulateurs et les Th2. De ce fait, elle apparaît comme un frein aux réponses inflammatoires

excessives (Bikle 2011). Dans les lymphocytes T, la 1,25 (OH)₂D₃ diminuent la production d'IL-2, d'IL-17 et IFN γ et atténue l'activité cytotoxique et la prolifération des LTCD4⁺ et CD8⁺. La 1,25 (OH)₂D₃ pourrait également favoriser le développement des LT de type 1 (TR1) produisant de l'IL-10, ce qui supprime le développement des autres sous-classes Th (Sakaguchi *et al.*, 2008).

Les LB possèdent le VDR, ainsi que le CYP27B1 permettant un effet intracrine du calcitriol, qui inhibe la prolifération de ces cellules et leur production d'anticorps (Lang *et al.*, 2013). Enfin, la 1,25 (OH)₂D₃ bloque la prolifération des LB, la différenciation des cellules plasmiques et la production d'immunoglobulines et les cellules souches stromales dérivées adipeuses ASC les anticorps (Bikle 2011).

1.2.4 Métabolisme

Les humains ont une combinaison de vitamines D₂ et D₃, toutes deux produites par l'exposition aux rayons UV. La vitamine D₂ est synthétisée pendant le rayonnement Ultra violet (UV) de l'ergostérol, tandis que la vitamine D₃ est produite par l'exposition aux rayons UV (290–315 nm) de la peau en convertissant le 7-déhydrocholestérol de la peau en prévitamine D₃ et, par la suite, en vitamine D₃. (Zarogoulidis *et al.* 2013)

La biosynthèse commence au niveau cutané sous l'effet du rayonnement ultraviolet, La vitamine D₂ et la vitamine D₃ sont transportées dans le sang par la (DBP).

Le métabolisme continue au niveau hépatique par l'hydroxylation en 25. Cette hydroxylation hépatique est très peu régulée ; plus on ingère ou plus on synthétise de vitamine D, plus on fait de la 25(OH)D

La synthèse se termine au niveau rénal par l'hydroxylation en 1 après plusieurs étapes successives.

cette hydroxylation est très étroitement régulée par des hormones du métabolisme phosphocalcique comme la Parathormone (PTH) ou le Facteur 23 de croissance du fibroblaste (FGF-23) qui permet de produire la 1,25(OH)₂D₃ "hormone" (qui passera dans le sang et agira sur des tissus cibles). (Figure 1.3) (Souberbielle 2011)

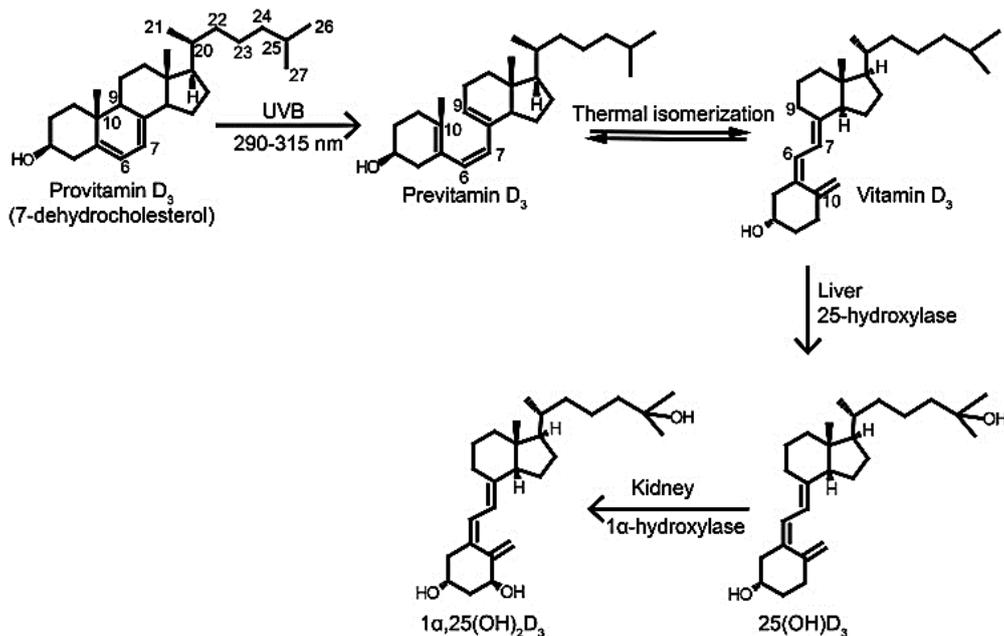


Figure 1.5 : Biosynthèse de la vitamine D : conversion du 7-déhydrocholestérol en prévitamine D instable sous l'action des rayons UVB, puis conversion de la pré-vitamine D en cholécalficérol puis en 1,25(OH)D₃ (Molin 2019). UVB : rayon ultras violet .

La vitamine D existe sous deux formes principales : la forme déstockage (25-OH vitamine D₃ ou calcidiol) et la forme active (1-25-OH₂ vitamine D₃ ou calcitriol).

La 1-25-OH₂ vitamine D₃ est une hormone stéroïde et, à ce titre, elle agit comme tel au niveau cellulaire, avec une liaison initiale cytoplasmique au récepteur de la vitamine D (VDR) et qui va ensuite transloquer dans le noyau de la cellule et se fixer sur l'élément de réponse à la vitamine D (VDRE) et ainsi déclencher l'expression ou la répression des gènes cibles contrôlés par la vitamine D. (Bacchetta 2019)

Environ 80 à 90 % des besoins en vitamine D proviennent de la production endogène, les 10 à 20 % restant étant apportés par l'alimentation. La vitamine D n'est donc pas une vitamine au sens strict du terme (composé essentiel, qui ne peut être produit par l'organisme). La photosynthèse de la vitamine D₃ dépend directement de l'exposition solaire, à la fois de sa durée, de sa qualité (longueurs d'onde appropriées) et de son intensité, d'où l'existence de variations saisonnières et géographiques (Molin 2019).

1.2.5. Mécanismes de régulation

C'est au niveau de l'enzyme 1α -hydroxylase rénale que s'effectue le contrôle de la concentration en vitamine D active. L'hydroxylation rénale est régulée par différents systèmes selon les besoins de l'organisme.

-La PTH stimule l'expression de la 1α hydroxylase et donc la conversion de la 25 (OH) D en 1,25 (OH) D₂. A l'inverse, la vitamine D exerce un rétrocontrôle négatif sur la synthèse de PTH en inhibant la synthèse par les glandes parathyroïdes.

-la calcitonine stimule l'expression de la 1α -hydroxylase et celle de PTH.

-l'hypocalcémie et l'hypophosphatémie stimulent l'expression de la 1α - hydroxylase. A l'inverse l'hypercalcémie et l'hyperphosphatémie l'inhibe.

-le FGF23 qui est un facteur libéré par l'os en croissance, témoin d'un climat phosphocalcique satisfaisant, effectue un rétrocontrôle négatif sur la 1α -hydroxylase et stimule la synthèse de la 24- hydroxylase. De plus, il diminue directement l'absorption phosphocalcique intestinale et la réabsorption rénale. Ceci entraîne une diminution de concentration de 1,25 (OH) D₂. A l'inverse, la vitamine D exerce un rétrocontrôle positif sur la synthèse de FGF 23 par l'ostéocyte.

- le taux de 1,25 (OH) D₂ circulant s'autorégule lui-même : un excès inhibe la production et l'activité de la 1α -hydroxylase et stimule la 24, hydroxylase ce qui permet de réduire sa propre concentration. .

- d'autres hormones stimulent la production de 1,25OH₂D (insuline, prolactine, hormone de croissance) .(Figure 1.4) (Selma et Habiba 2017)

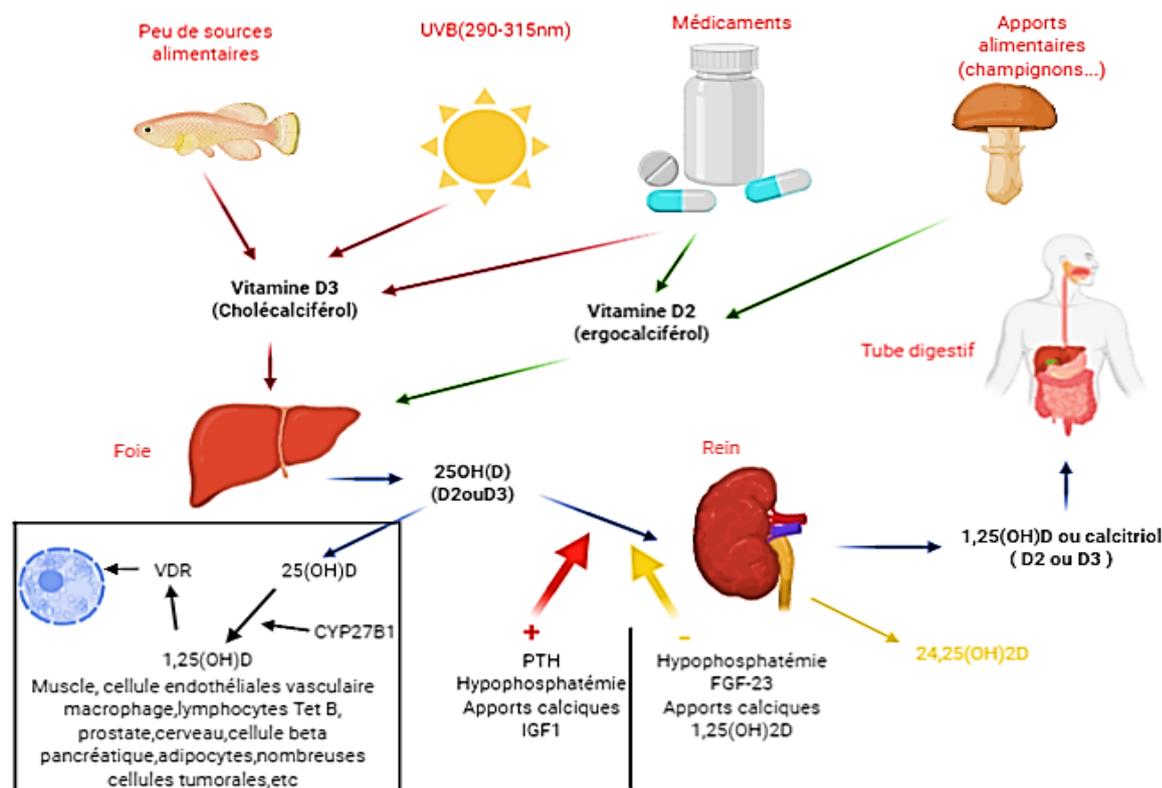


Figure 1.6. le métabolisme de la vitamine D (Salle, 2012). VDR : récepteur de la vitamine D, PTH : Parathormone FGF-23 : Facteur 23 de croissance du fibroblaste, 1,25(oh)2D : 1,25 dihydroxyvitamine D, IGF1 : facteur de croissance analogue à l'insuline-1 ,CYP27B1 : La 25-hydroxyvitamine D₃ 1-alpha-hydroxylase , 25OH(D) : 25OH vitamine D3 ou calcidiol

La vitamine D3 joue un rôle dans de nombreuses voies de signalisation. Il y a les voies non génomique et génomique.

1.2.6.1. Voie non génomique

Dans cette voie, la vitamine D3 agit à travers des récepteurs (protéines membranaires) dont la protéine disulfide isomérase de la 3 famille (Pdia 3) également appelée ERp 57, la Glucose-régulatrice de protéine 58 (GRP 58) ou Membrane Rapid d'association de stéroïde réponse (MARRS). Ceux-ci, en se liant à la membrane et aux seconds Messagers, déclenchant une série de systèmes de transduction (Nemere et al. 2010, 57).

Dans de nombreux types de cellules comme les kératinocytes, les entérocytes, les cellules musculaires et les ostéoblastes, la 1,25 (OH)₂ D₃, en se fixant au récepteur Pdia 3, active l'influx de calcium cellulaire et sa libération intracellulaire. (Landrier 2014)

De même, elle module ou stimule la Protéine Kinase C (PKC), l'adénylate cyclase, les phospholipases A2 et C ou la protéine activée par un mitogène (Mitogen-Activated Protein kinase (MAP kinase) (Landrier 2014) .

Certaines actions non génomiques de la 1,25- dihydroxyvitamine D3 se produisent à travers des récepteurs de la vitamine D ancrés à la membrane, comme c'est le cas de la 1,25- dihydroxyvitamine D3 associée au MARRS. La MARRS est située dans les radeaux lipidiques des membranes et peut activer différentes kinases, phosphatases et canaux ioniques (Nemere et al. 2010, 57)

Ont cependant montré l'implication du VDR dans cette voie de signalisation rapide, confirmant ainsi le rôle central de VDR dans la médiation des effets de la vitamine D3. (Figure 1.5) (Pawlowska et al., 2016)

1.2.6.2. La voie génomique

Les effets génomiques font intervenir le récepteur VDR qui est exprimé dans la plupart des types cellulaires et est donc exprimé dans tous les tissus, ce qui signifie que toutes les cellules ou presque sont des cibles potentielles du calcitriol. La distribution ubiquitaire du VDR permet d'expliquer le grand nombre de gènes dont la régulation est sous la dépendance directe ou indirecte de la 1,25(OH)2D.

Ceci se traduit par des effets de la vitamine D sur la régulation de gènes impliqués dans des voies métaboliques aussi variées que le métabolisme du calcium, la prolifération, la différenciation cellulaire, l'inflammation, l'apoptose ou encore l'angiogenèse pour ne citer que quelques exemples. Dans la cellule, la 1,25(OH)2D se lie au VDR .

Le complexe VDR-1,25(OH)2D est transloqué au noyau de la cellule où il s'associe au Le récepteur X de rétinoïdes (RXR) . L'hétérodimère RXR-VDR en présence de ligand se lie à l'acide désoxyribonucléique (l'ADN) en des sites appelés éléments de réponse à la vitamine D (VDRE), dans les régions promotrices des gènes dont l'expression est ainsi activée ou réprimée.

Cet effet inducteur ou répresseur est un phénomène complexe qui implique le recrutement de Co activateurs ou de corépresseurs lors de la fixation du ligand au VDR. De même le niveau de méthylation et d'acétylation de la chromatine sont des éléments qui vont orienter la régulation génique dans le sens de l'induction ou de la répression. (Figure 1.5) (Landrier 2014)

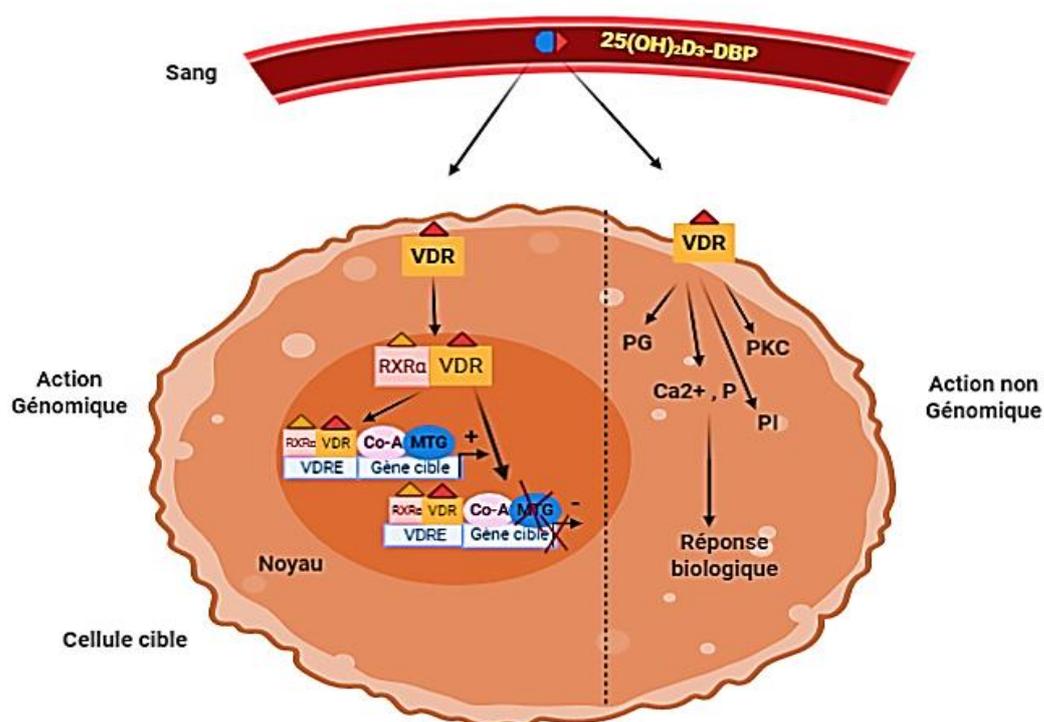


Figure 1.7. Voies de signalisations non génomique et génomique de la forme active de la vitamine D3 (Zmuda et *al.*, 2000). RXR : récepteur X de rétinoïdes, VDR : récepteur de la vitamine D, Co-A : coenzyme A, VDRE : cite de fixation du VDR, PKC : proteine kinase C .

1.2.7. Analogues synthétiques

De nombreux analogues de vitamine D synthétiques (Figure 1.6) sont à ce jour décrits, capables de lier le récepteur de la vitamine D pour en reproduire tout ou en partie des effets (agonistes) ou pour s'opposer aux effets de la vitamine D (antagonistes). (Molin 2019)

Certains d'entre eux ne diffèrent de la 1,25-(OH)₂D que par leur structure tridimensionnelle, mais présentent des différences en termes d'affinité et d'activité. (Molin 2019)

Ces analogues dont la structure tridimensionnelle est fixe (contrairement à celle de la vitamine D) permettent d'étudier les fonctions associées aux différentes conformations de vitamine D. (Figure 1.6) (Molin 2019)

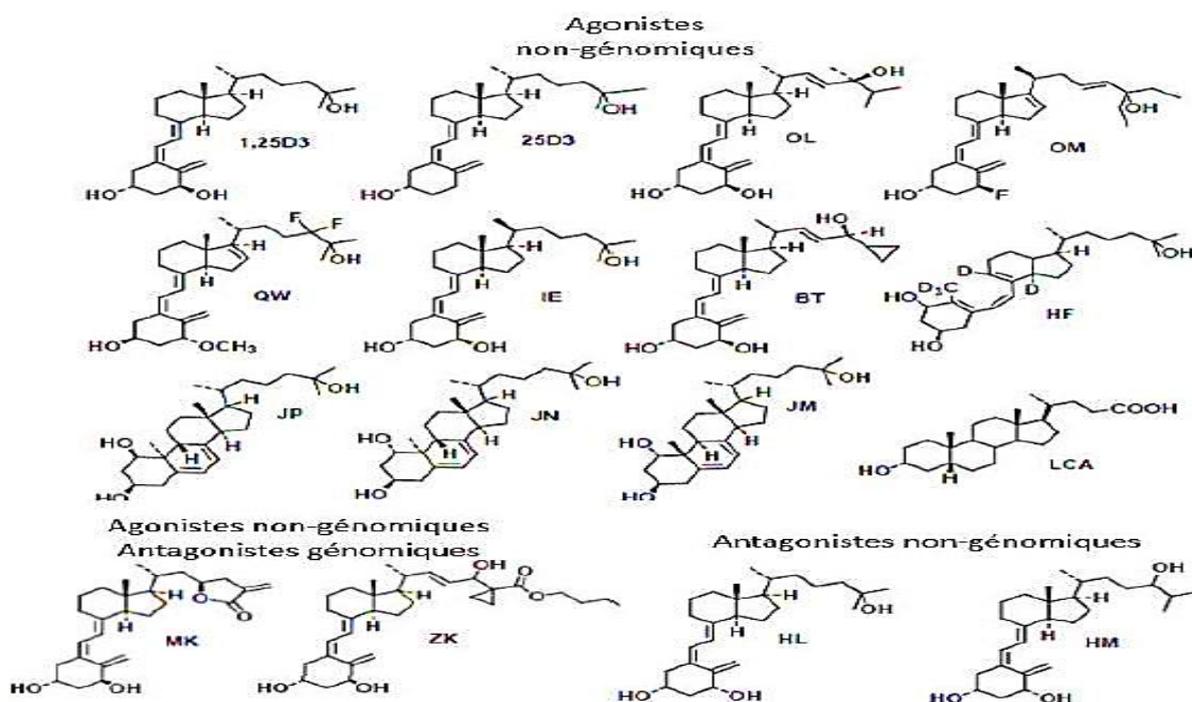


Figure 1.8. Molécules analogues de la vitamine D capables de se lier au VDR (Molin 2019)

1.3. Le récepteur de la vitamine D

Le récepteur de la vitamine D est codé par le gène VDR (12q13.11), exprimé dans l'ensemble des tissus cibles de la vitamine D.

A l'échelle cellulaire, le VDR peut être localisé dans le noyau et dans le cytosol dans des domaines associés aux radeaux lipidiques de type cavéole lipidique. Il s'agit d'une protéine de 427 acides aminés dont la séquence est fortement conservée ; appartenant à la famille des récepteurs nucléaires aux hormones stéroïdes. Ce récepteur possède des fonctions de facteur de transcription (il lie l'ADN pour favoriser ou inhiber l'expression de gènes cibles).

L'étude de sa structure révèle la présence de différents domaines fonctionnels : un domaine de liaison à l'ADN avec doigts à Zinc (Domaine de liaison à l'ADN, DBD), un domaine de reconnaissance du ligand et un domaine d'interaction avec d'autres facteurs de transcription (Figure 1.7) (co-represseurs ou co-activateurs). (Molin 2019)

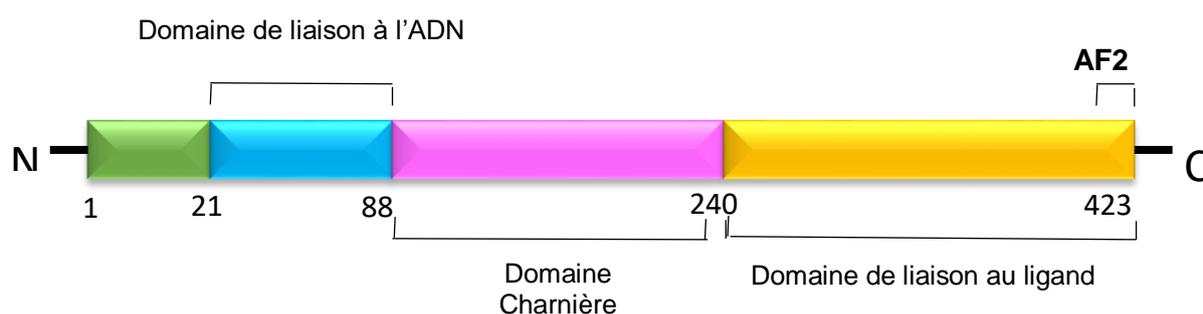


Figure 1.9. Représentation schématique du récepteur de la vitamine D. (Molin

2019) .AF2 : domaine transactivateur . Le récepteur de la vitamine D comprend (de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale) un domaine de liaison à l'ADN, un domaine charnière conférant sa flexibilité à la molécule, un domaine de liaison au ligand (vitamine D, hétérodimérisation avec le récepteur au rétinoïde RXR, interaction avec la machinerie transcriptionnelle) et enfin un domaine transactivateur AF2.

1.3.1. Le gène du VDR

Le gène codant pour le récepteur nucléaire humain de la vitamine D est situé sur le chromosome 12, en position 12q13.11. Il mesure 75Kb et code pour une protéine de 50 à 70 KDa. Il est constitué de quatorze exons dont six exons non traduits, non codants (exons 1A 1F), et de plusieurs régions promotrices. Il est aussi composé d'une région 5' non transcrite (5'UTR) du promoteur du gène, d'une région de codage et de la région 3' non transcrite (3'UTR) . La région 5' non transcrite du VDR est codée par l'exon 1 composé lui-même de trois (3) séquences formant les exons 1A, 1B, 1C impliqués dans la synthèse de quatre (4) transcrits différents du VDR.

Les motifs en doigt de zinc du domaine de liaison sont codés par les exons 2 et 3. La zone Hinge est codée par les exons 4 et 5 et la région LBD par les exons 7 à 9. Le transcrite de l'ARN messager (ARNm) du VDR est composé de 4628 bases et code pour un polypeptide de 427 acides aminés avec une masse moléculaire de 48 KDa .(Huet 2011)

1.3.3. Régulation de l'activité du Récepteur de la vitamine D

L'activité du VDR peut être régulée au niveau des différentes étapes de son métabolisme à savoir l'accessibilité du ligand au VDR, le contenu cellulaire en VDR, les modifications post translationnelles du récepteurs et la disponibilité des Coactivateurs nucléaires (Haussler et al. 2008). Les concentrations de VDR dans une cellule cible sont régulées par les concentrations de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ et de ses métabolites (régulation homologue), mais aussi par d'autres hormones ou facteurs de croissance qui ne se lient pas

au VDR (up-regulation heterologue) . Ces deux modes de régulation sont impliqués dans le contrôle de la transcription du gène codant pour le VDR, dans la stabilisation de son ARNm et dans l'altération de sa vitesse de dégradation qui dépend des tissus et des cellules qui lui sont spécifiques. Ainsi, la 1,25 (OH)₂ D₃ stimule l'ARNm du VDR dans les glandes parathyroïdes et le rein, mais pas dans l'intestin (Brown et al. 1995). Enfin, les facteurs qui interviennent dans le catabolisme du VDR régulent également celui-ci. Une régulation directe du VDR par SUG1 (composant du proteasome, intervenant dans l'ubiquitination et la protéolyse du VDR) a été mise en évidence. Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs du proteasome a permis de ralentir la dégradation du VDR par cette voie (Masuyama et MacDonald 1998).

1.3.4. Polymorphismes des séquences du récepteur de la vitamine D

1.3.4.1. Polymorphismes étudiés du VDR

L'analyse des séquences d'ADN révèle des polymorphismes génétiques qui expliquent en partie, les différences d'un individu à l'autre. Ainsi, plus de 470 polymorphismes ont été décrits (Ashktorab et al. 2011). Les polymorphismes du VDR, les plus fréquemment analysés, correspondent aux sites de clivage d'endonucléases *Fok-1*, *Bsm-1*, *Apa-1* et *Taq-1* (Figure 1.8). Leur signification fonctionnelle et les effets potentiels sur la susceptibilité aux maladies ont été largement étudiés. (Mohapatra et al. 2013)

- Le polymorphisme Fok-1 est localisé au niveau de l'exon 2 et consiste en une transition T>C. Il modifie fondamentalement un codon ATG (Met) en un codon ACG (Thr) situé à dix paires de bases en amont du codon d'initiation de traduction, ce qui entraîne la formation d'un codon d'initiation supplémentaire (Khan *et al.*, 2014). Il s'agit d'une substitution d'un nucléotide T (Thymine) en C (Cytosine) au niveau des deux sites potentiels d'initiation de la traduction. Il en résulte une protéine VDR plus courte de trois acides aminés. Ce polymorphisme a un rôle fonctionnel majeur dans l'activation transcriptionnelle du gène du VDR. (Uitterlinden, Fang, van Meurs, et al. 2004) (Figure 1.8)
- Le polymorphisme Bsm-1 est localisé au niveau de l'intron 8 et consiste en une transition A>G. Il s'agit d'une substitution d'un nucléotide A (Adénine) en G (Guanine) (Mackawy et Badawi 2014). (Figure 1.8)

- Le polymorphisme Apa-1 est localisé au niveau de l'intron 8 et consiste en une transversion A>C. Il s'agit d'une substitution d'un nucléotide A (Adénine) en C (Cytosine) (Faraco *et al.* 1989). (Figure 1.8)
- Le polymorphisme Taq-1 est localisé au niveau de l'exon 9 et consiste en une transition T/C (Salimi *et al.*, 2015). Ce polymorphisme Taq-1 est une substitution d'un nucléotide donnant un codon ATC au lieu de ATT initial dans l'exon 9 (Khan *et al.*, 2014). Il s'agit d'une substitution d'un nucléotide T (Thymine) en C (Cytosine) conduisant à un changement synonyme (isoleucine) au niveau du codon 352. (Figure 1.8) (Salimi *et al.* 2015).

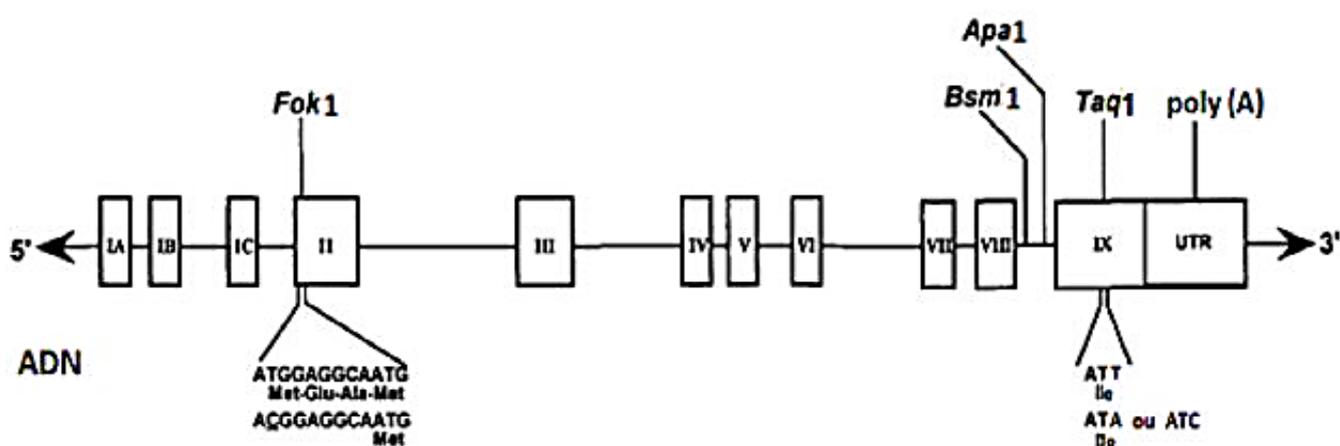


Figure 1.10 .Sites des polymorphismes principaux du gène codant pour le VDR

(Zmuda *et al.*, 2000). (A : adénine ,T : thymine , G : guanine , Met : méthionine , Glu : glutamine , Ala : alanine , UTR : trois principales régions transcrites non traduites , ADN : l'acide désoxyribonucléique .

1.3.5. Polymorphismes du gène VDR et vitamine D3

Dans des régions codantes ou non d'un gène, il peut y avoir une substitution d'une paire de bases par un nucléotide appelé Polymorphisme nucléotidique unique (SNP). Différents SNP influencent le statut en vitamine D3. Ils peuvent concerner les gènes codant pour les enzymes intervenant soit dans la synthèse, soit dans le catabolisme de la 25 (OH) D3 et de la 1,25 (OH)₂ D3, et peuvent ainsi influencer les concentrations sériques de vitamine D3 (Köstner *et al.* 2009).

Ces polymorphismes du VDR varient en fonction des ethnies et pourraient expliquer pourquoi certaines populations sont plus à risque de déficit en vitamine D3 ou de pathologies dépendantes de la vitamine D3, que d'autres (Egan et al. 2010). En définitif, les polymorphismes génétiques du VDR constitueraient un facteur important de susceptibilité individuelle aux effets biologiques de la vitamine D3 (Uitterlinden, Fang, Van Meurs, et al. 2004).

1.3.6. VDR et asthme

Des études récentes ont indiqué que la vitamine D jouait un rôle dans la pathogenèse de nombreuses maladies inflammatoires, y compris l'asthme

Il existe une littérature croissante suggérant un lien entre la carence en vitamine D et l'asthme chez les enfants, mais des revues systématiques font défaut.

Dans une étude récente ils ont pu évaluer la prévalence de la carence en vitamine D chez les enfants asthmatiques et les corrélations des niveaux de vitamine D avec l'incidence de l'asthme, le contrôle de l'asthme et les fonctions pulmonaires.

PubMed, EMBASE et Cochrane Library ont été recherchés pour des études observationnelles sur l'asthme et la vitamine D. Deux auteurs ont extrait les données indépendamment.

La méta-analyse a été effectuée à l'aide du logiciel Review Manager. Un total de 23 (11 cas-témoins, 5 cohortes et 7 études transversales) portant sur 13 160 participants ont été incluses dans cette recherche.

- Globalement, la carence en vitamine D et l'insuffisance était prévalente chez 28,5% et 26,7% des enfants asthmatiques, respectivement.
- La moyenne de 25 (OH) D (10 études) étaient significativement plus faibles chez les enfants asthmatiques que chez les enfants non asthmatiques une différence moyenne de $-9,41$ (intervalle de confiance à 95% [IC] $-16,57$, $-2,25$).
- Le rapport concernant la carence en vitamine D (huit études cas-témoins) était significativement plus élevé chez les enfants asthmatiques que chez les enfants non asthmatiques (cotes rapport 3,41; IC à 95% 2,04, 5,69).
- La corrélation entre les niveaux de vitamine D et l'incidence de l'asthme, les fonctions pulmonaires et le contrôle d'asthme ont eu des résultats mitigés.

Pour conclure, les enfants asthmatiques avaient des taux de 25 (OH) D inférieurs à ceux des non asthmatiques mais les corrélations entre le 25 (OH) D et l'incidence de l'asthme, le contrôle de l'asthme et les fonctions pulmonaires variaient.

Des essais contrôlés randomisés bien conçus sont nécessaires pour déterminer si les enfants asthmatiques peuvent bénéficier de supplémentation en vitamine D. (Jat et Khairwa 2017)

D'autre part ces dernières années, les polymorphismes génétiques de l'asthme ont été examinés et plusieurs loci de sensibilité, dont Les régions 2q, 5q, 6q, 11q, 12q et 13q ont été identifiées

L'association entre les polymorphismes des récepteurs de la vitamine D (VDR) et le risque d'asthme reste pas clair.

Une étude en 2019 visait à étudier l'effet des polymorphismes du gène VDR et de l'ARNm du VDR niveaux d'expression sur la fonction respiratoire, les niveaux d'oxyde nitrique dans l'air expiratoire et les niveaux sériques de vitamine D dans les enfants asthmatiques.

- L'étude a inclus 80 enfants en bonne santé (groupe témoin) et 100 enfants asthmatiques (groupe asthmatique) entre 5 et 18 ans. Les génotypes VDR (Apal, Taql et FokI) et VDR Les niveaux d'ARNm ont été déterminés dans tous les groupes.

Résultats de cette étude :

- Il n'y avait pas de différence statistiquement significative dans les niveaux de vitamine D entre le groupe asthmatique et le groupe témoin ($P > 0,05$).
- Une association significative a été trouvée entre les deux génotypes (CC) du polymorphisme Taql [rapport de cotes (OR) = 0,2, intervalle de confiance (IC) à 95% (0,07–0,5), $P = 0,003$] et génotype (CA) de Polymorphismes Apal [OR = 0,2, IC 95% (0,07–0,8), $P = 0,02$] et risque d'asthme.

De plus, lorsque le single nucléotide (SNP)

- Les fréquences alléliques du polymorphisme entre l'asthme et les groupes témoins ont été comparées, il n'y a pas association significative ($P > 0,05$). Par rapport au groupe témoin, l'expression de l'ARNm du VDR dans le groupe asthme diminué dans les génotypes CC et CA d'Apal et dans les génotypes TT et TC de Taql ($P < 0,05$).

Conclusion de la recherche : Les résultats fournissent des preuves à l'appui d'une association entre les polymorphismes Taql et Apal et la sensibilité à l'asthme. (Kilic et al. 2019)

Dans une étude en 2020 ils ont réussi à génotyper cinq SNP du gène VDR (rs2525046, rs9729, rs1544410 (BsmI), rs22239179 et rs2228570 (FokI)) chez 657 enfants avec asthme aigu, bronchiolite ou une respiration sifflante.

Afin d'établir la relation entre les SNP VDR et l'exacerbation les scores de gravité, il ont l'utilisé comme traitement agonistes β_2 et ils ont analysés la fréquence des exacerbations respiratoires en utilisant une régression multiple.

- Le génotype CT rs2525046 (FokI) a été associé à des niveaux d'intensité d'ARNm de VDR plus élevés ($p = 0,007$) par rapport au génotype CC.

- Une tendance à la signification ($p = 0,056$) a été identifiée entre le RS2525046 génotype TT et des niveaux plus élevés d'intensité d'ARNm de VDR par rapport au génotype CC.
- Enfants avec rs2228570 AA génotype présentait des scores de gravité d'exacerbation plus élevés ($p = 0,001$) et une réponse au traitement par β 2-agoniste plus faible (doses à 6 h: $p = 0,009$ et 12 h: $p = 0,033$) par rapport à ceux avec le génotype GG.
- Enfants avec rs1544410 (BsmI) TT génotype avait des scores de gravité d'exacerbation inférieurs ($p = 0,005$) par rapport à ceux avec le génotype CC.
- Les enfants avec le génotype rs2228570 GA présenté et / ou admis à l'hôpital plus de fois depuis la naissance avec des maladies respiratoires ($p = 0,011$) et une respiration sifflante ($p = 0,021$) que les enfants avec le génotype GG.

Les résultats de cette étude suggèrent que des variantes génétiques au locus VDR pourraient jouer un rôle dans la respiration sifflante et la gravité de l'asthme chez les enfants. (Leiter et *al.* 2020)

Donc d'après ces études le récepteur VDR semble être un gène candidat pour l'asthme. Les effets de la vitamine D sur le système immunitaire se présentent généralement sous la forme de tolérance, immunomodulation et immunosuppression. Plus précisément, la vitamine D cible les gènes codant pour les pro inflammatoire et les cytokines anti-inflammatoires, qui jouent un rôle dans le développement de l'inflammation des voies aériennes. (Kilic et *al.* 2019)

En raison du lien entre l'asthme et la carence en vitamine D sur la relation entre les gènes impliqués dans le métabolisme de la vitamine D et les phénotypes de l'asthme.

On peut donc dire que Le polymorphisme du gène VDR (Apa, Taq,Fok) a un lien avec la progression de la maladie chez des patients asthmatiques, la plupart de ces études ont apporté un soutien pour l'idée que la vitamine D offre une protection contre l'asthme et d'autres maladies allergiques et une forte association entre les niveaux de vitamine D, le développement, la gravité de l'asthme, ainsi que la fonction pulmonaire.(Kilic et *al.* 2019)

1.4. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

1.4.1. Principes

La PCR est une technique qui permet l'amplification des acides nucléiques humains ou exogènes. Elle repose sur la capacité d'une enzyme, une ADN polymérase, à synthétiser le brin complémentaire d'un ADN servant de matrice. La PCR correspond à une amplification d'un fragment d'ADN spécifique délimité par des amorces (ou primer). Celles-ci sont

constituées d'un segment de 17 à 30 bases d'acide nucléique. Leur association à l'ADN cible est suivie d'une élongation par la polymérase, aboutissant à la synthèse d'un ADN double brin. Cette amplification est répétée un certain nombre de fois afin d'obtenir une quantité d'ADN suffisante pour être détectée et analysée. (REDOUANE TELLAA 2013) (Figure1.9)

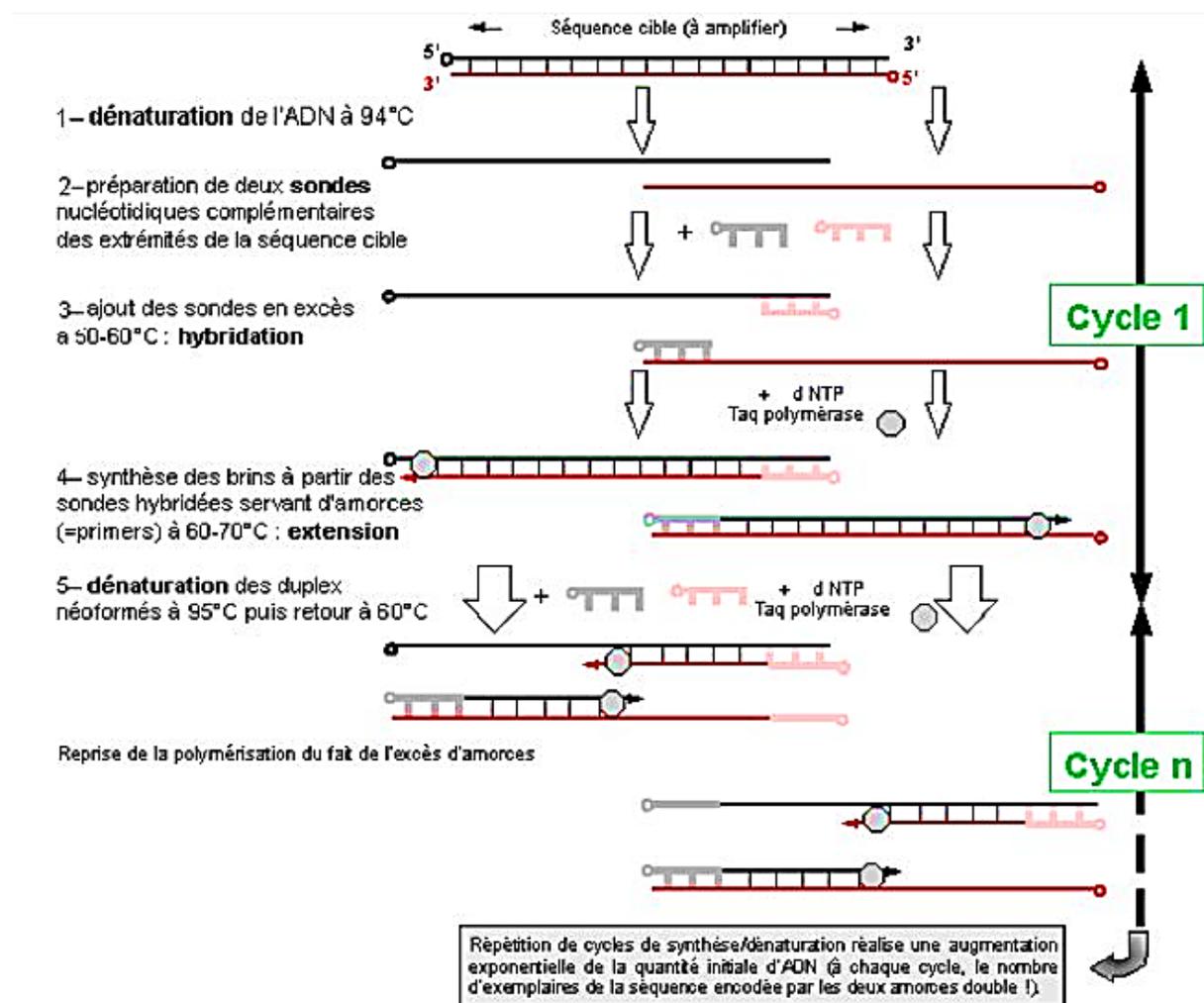


Figure 1.11: Schéma de principe de la technique de PCR. (REDOUANE TELLAA 2013)

Polymérase Chain Réaction (amplification en chaîne par polymérase). Cette technique permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN (environ 1 million de copies en quelques heures). C'est, généralement suffisant pour une utilisation ultérieure.

1.4.2. Acteurs de la PCR

1.4.3.1. L'acide désoxyribonucléique

Contenant le fragment à amplifier Situé dans le noyau de la cellule, il est constitué de deux brins formant une double hélice. L'ADN est formé d'unités de bases, les nucléotides (une base + un sucre [le désoxyribose] + un phosphate), reliés par des liaisons phosphodiesters. On distingue quatre bases:

- les bases puriques: adénine (A) et guanine (G)
- les bases pyrimidiques : cytosine (C) et thymine (T) Les deux chaînes d'ADN forment une double hélice en établissant au niveau de leurs bases des liaisons de faible énergie, les liaisons "hydrogènes". Celles-ci se forment selon les règles d'appariement suivantes : 21 - la base A est associée à la base T par deux liaisons hydrogènes. - la base G est associée à la base C par trois liaisons hydrogènes.

Chaque brin d'ADN possède une extrémité 5'-phosphate et une extrémité 3'- hydroxyle. Par convention une orientation a été définie : elle se fait de 5' vers 3' (5' 3'). Par ailleurs, les Deux brins sont orientés en sens opposé : on dit qu'ils sont antiparallèles. On peut facilement séparer les liaisons hydrogènes : on parle alors de dénaturation. Celle-ci est réversible. La réassociation s'appelle la renaturation ou hybridation. Elle peut se faire ADN/ADN, ADN/ARN ou ARN/ARN. L'ADN cible sera extrait du milieu biologique à analyser (cultures cellulaires ou d'organismes, prélèvements sanguins, squames, biopsies...). (REDOUANE TELLAA 2013)

1.4.2.2. Les amorces sens et antisens

Ce sont des oligonucléotides d'une taille comprise entre 17 pb et 30 pb. Idéalement, ils doivent être parfaitement complémentaires de la cible à analyser (l'une sur le 1er brin et l'autre sur le brin complémentaire) et posséder une composition globale de 50 % [G+C]. Par ailleurs, ces amorces ne doivent pas s'hybrider sur elles-mêmes (auto-hybridation) ou entre elles, ni former de boucles sur elles-mêmes (structure en "épingle à cheveux"). Si c'est le cas, elles formeront des bandes parasites appelées dimères d'amorces. La présence de ceux-ci diminuera la sensibilité de la PCR. Les températures de fusion (T_m) des amorces doivent être voisines et suffisamment élevées pour empêcher les hybridations non spécifiques. La taille du segment amplifié sera déterminée par la distance entre les amorces. (REDOUANE TELLAA 2013)

1.4.2.3. L'ADN polymérase et ses inhibiteurs

On utilise la Taq-Polymérase. Cette enzyme a été purifiée à partir d'une bactérie vivant à proximité de sources d'eau chaude à 80° C, *Thermus aquaticus*. Il s'agit d'une ADN polymérase ADN-dépendante possédant une activité exonucléase 5' 3' mais sans activité 3'5' (pas d'action correctrice). C'est une enzyme thermorésistante dont la température optimale de fonctionnement est comprise entre 70 et 75°C et dont la demi-vie est supérieure à 2h à 92° C et de 40 minutes à 95° C. (REDOUANE TELLAA 2013)

Cette propriété de thermo résistance est à l'origine de son utilisation dans la technique d'amplification génique PCR. Depuis sa découverte cette enzyme a été clonée et modifiée afin d'augmenter sa résistance à la température. Cette enzyme possède des inhibiteurs qui sont nombreux et sont présents dans de nombreux échantillons biologiques tels que sang, selles et urines. Parmi les inhibiteurs identifiés, on peut citer : l'hème, l'héparine, le SDS (sodium Dodécyl sulfate), le phénol et les polyamines. Il existe des moyens de lever cette inhibition : par dilution de l'échantillon, par chauffage de l'échantillon, par purification de l'échantillon "réextraction", par changement d'ADN polymérase: elles sont plus ou moins résistantes à l'action des inhibiteurs, par utilisation de "facilitateurs" (la sérum-albumine-bovine, la bêtaïne, alpha2-macroglobuline ...). (REDOUANE TELLAA 2013)

1.4.2.4. Les nucléotides dNTPs

Les quatre désoxyNucléotides-Triphosphates: dGTP, dATP, dTTP et dCTP, seront Assemblés par la Taq-polymérase et formeront le brin d'ADN complémentaire. (REDOUANE TELLAA 2013)

1.4.2.6. Le Magnésium (Mg ++)

Ce cation est un cofacteur indispensable au bon fonctionnement de la polymérase et à l'incorporation des précurseurs. Il doit être apporté en concentration précises sous forme de MgCl₂. Tous ces composants seront mélangés dans le même tube réactionnel. (REDOUANE TELLAA 2013)

1.5. La conception des amorces

Le diagnostic moléculaire, qu'il se fasse par PCR ou par hybridation, nécessite la conception d'oligonucléotides, c'est-à-dire de courtes séquences nucléotidiques qui serviront dans un cas à alimenter la PCR (on parle alors d'amorces). Traditionnellement, la conception

des amorces se fait par l'analyse, à l'œil, d'un alignement multiple. Dans plusieurs contextes, mais particulièrement dans celui du diagnostic moléculaire, la bio-informatique peut apporter une aide énorme en automatisant le processus d'analyse de séquences afin de trouver des régions d'intérêt pour des amorces. Conception automatisée d'amorces et de sondes aux fins de diagnostic moléculaire.

1.6. Problématique et objectifs

1.6.1. Problématique

La vitamine D a été proposée pour réguler l'état inflammatoire par l'expression des gènes et la production de cytokines.

Dans l'asthme allergique pédiatrique on suppose qu'une carence en vitamine-D pourrait être associée à un échec à réduire l'état inflammatoire. Cette action pourrait être directement sur les voies respiratoires.

Le récepteur VDR de la vitamine-D est présent dans les voies respiratoires et on pense qu'ils inhibent les cytokines pro-inflammatoires d'autre part les polymorphismes de ce récepteur ont un lien étroit avec la progression et la sévérité de la maladie chez des patients asthmatiques.

1.6.2. Objectif

Concevoir des amorces qui encadrent SNP du gène du récepteur VDR afin d'établir une PCR correcte qui va par la suite aider à la recherche et aux études de l'expression des gènes responsable de la pathogénèse de l'asthme allergique pédiatrique.

1.6.3. But

Etablir une relation entre la carence en vitamine D et le récepteur VDR dans l'asthme allergique pédiatrique.

CHAPITRE 2

Matériels et méthodes

2.1. L'initiation au travail	44
2.2. Les étapes établies	49
2.3. Confirmation des résultats	57
2.4. Discussion	57

CHAPITRE 2

Matériels et méthodes

2.1. L'initiation au travail

2.1.1. Introduction

Les amorces sont essentielles pour initier l'amplification de l'ADN, que ce soit à des fins de détection, de clonage ou de séquençage. Ainsi, il est crucial de comprendre comment concevoir avec succès des amorces.

L'amorce que nous allons concevoir a un impact sur l'ensemble du processus d'amplification de l'ADN. Les ADN polymérases, les enzymes qui catalysent la réplication de l'ADN, ne peuvent initier le processus de réplication qu'en ajoutant des nucléotides aux amorces. Afin de produire la séquence d'ADN souhaitée, nous devrons créer la bonne amorce. Ainsi, la conception d'amorce appropriée est nécessaire pour une amplification d'ADN réussie.

2.1.2. Amorces de PCR

Les amorces de PCR sont de courts fragments d'ADN simple brin (15-30 nucléotides dans longueur) qui sont complémentaires aux séquences d'ADN qui flanquent la région cible de l'intérêt. Le but des amorces de PCR est de fournir un groupe 3'-OH «libre» auquel l'ADN polymérase peut ajouter des dNTP.

Aussi ces amorces sont conçues pour avoir une séquence qui est le complément inverse d'une région de modèle ou ADN cible auquel nous souhaitons l'amorce

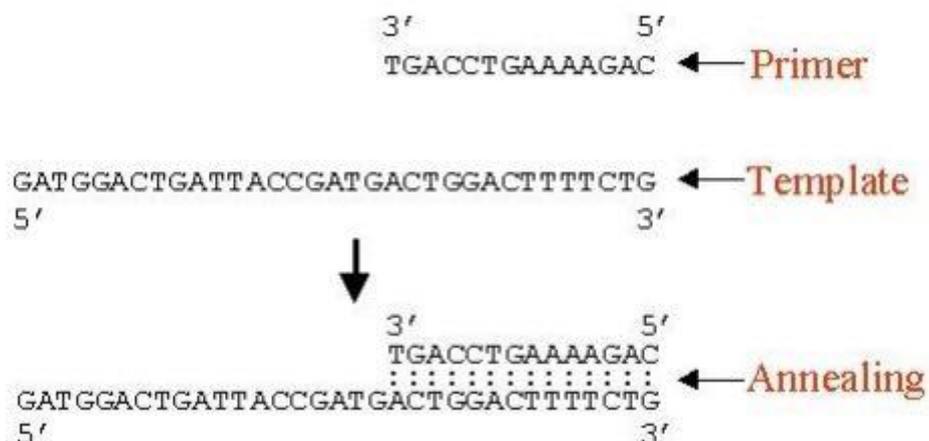


Figure 2.1. Exemple d'Alignement de l'amorce sur le brin modèle d'ADN

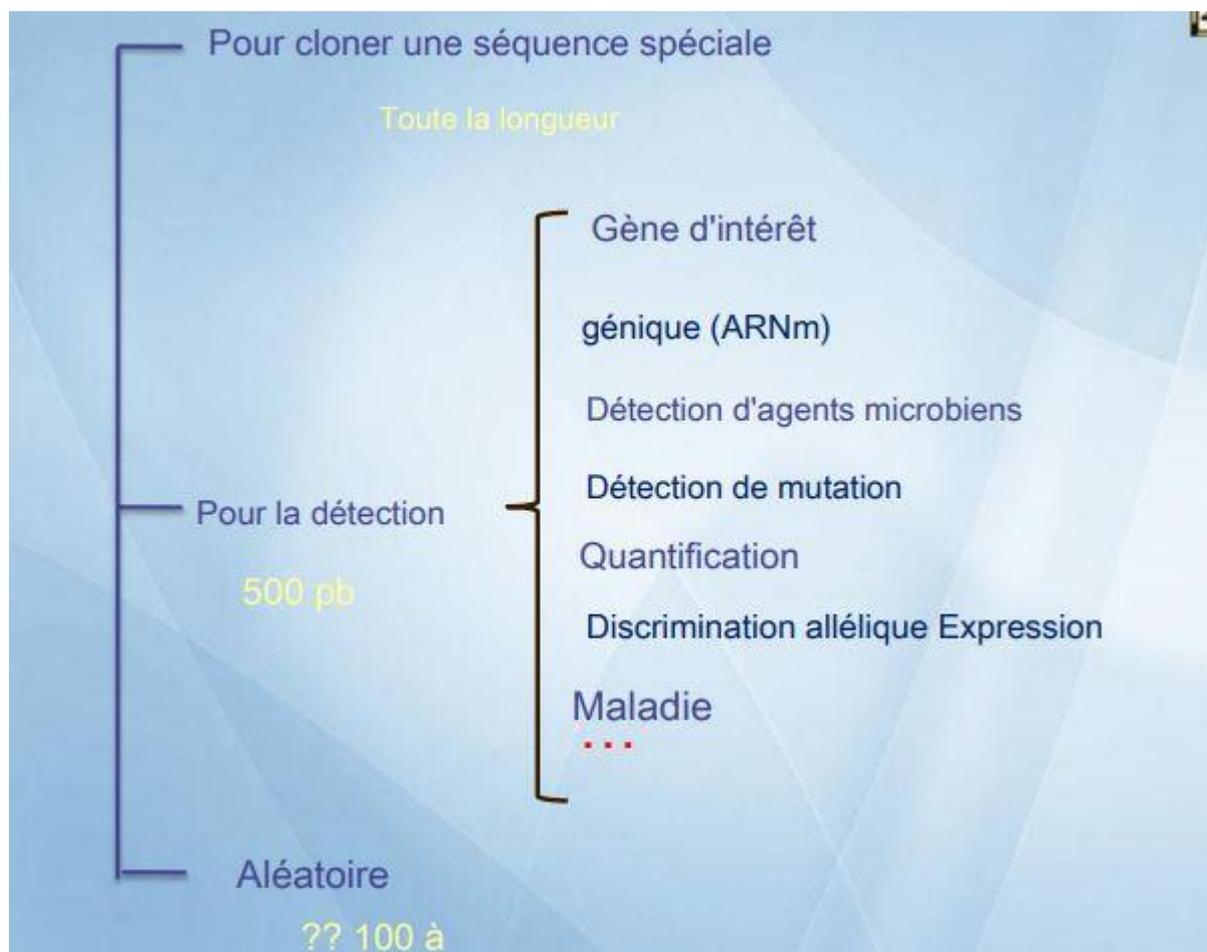


Figure 2.2. L'utilité d'une amorce

2.1.3. Identification des meilleures amorces

Il existe de nombreuses fonctionnalités qu'une bonne paire d'amorces devrait avoir pour la PCR en temps réel. En bref, voici ce que on doit rechercher :

- Ignorer les produits aspécifiques de plus de 1000 pb paires de bases.
- Longueur d'amorce: 18 - 22 nucléotides (optimal:20).
- GC% contenu: 50 - 60%. Les amorces doivent avoir un GC% similaire.
- Contenir une pince GC: Une pince GC a soit une base G ou une base C dans les 5 dernières bases de l'amorce. Étant donné que les bases G et C ont une affinité de liaison plus forte, cela garantira que l'extrémité 3 'de l'amorce s'hybride correctement à la séquence d'ADNc.
- Tm: 59 - 65 ° C (optimal: 62 ° C). Les amorces doivent avoir des Tm similaires qui sont à moins de 5 ° C les unes des autres.

- Évitez les répétitions de nucléotides: Évitez les répétitions de 4 répétitions adjacentes ou plus (par exemple GTTTT) et / ou les répétitions de dinucléotides (par exemple GCGCGCGC).
- Les amorces s'étendent sur la jonction exon-exon et / ou les amorces sont séparées par un grand intron : c'est pour empêcher l'amplification de l'ADN génomique.
- Sélectionnez des amorces qui se lient près de l'extrémité 3' du gène: ceci est particulièrement important si vous utilisez des oligo (dT) pendant la synthèse d'ADNc du premier brin qui se lient à la queue polyA à l'extrémité 3' du gène. Certains gros gènes peuvent ne pas s'amplifier complètement lors de l'utilisation d'oligo (dT), donc en ayant des amorces qui se lient à l'extrémité 3', l'efficacité devrait s'améliorer.
- Faible score d'auto-complémentarité: choisissez des amorces qui ont un faible score d'auto-complémentarité, comme indiqué dans le rapport d'amorce détaillé NCBI Primer-BLAST. L'auto-complémentarité est la probabilité que l'amorce se lie à elle-même et à l'autre amorce de la paire.
- Score d'auto-complémentarité faible de 3': Choisissez des amorces qui ont un score d'auto-complémentarité faible de 3', comme indiqué dans le rapport d'amorce détaillé NCBI Primer-BLAST. L'auto-complémentarité 3' est la probabilité que l'amorce se lie à elle-même et à l'autre amorce de la paire à l'extrémité 3'. Des scores élevés sont un bon prédicteur de la formation de dimères d'amorces.
- Amorces spécifiques à votre cible

A Éviter :

A. Évitez la formation d'épingle à cheveux et de boucle de tige

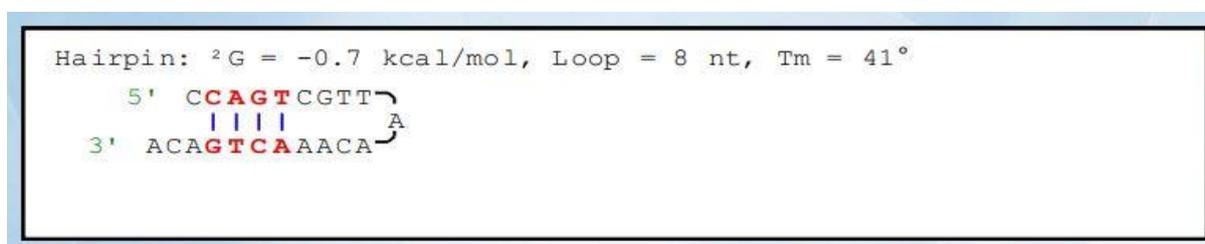


Figure 2.3. Représentation de la formation d'épingle à cheveux et boucle de tige entre l'amorce et le brin model.

B. Évitez la complémentarité à la fin de 3' des amorces

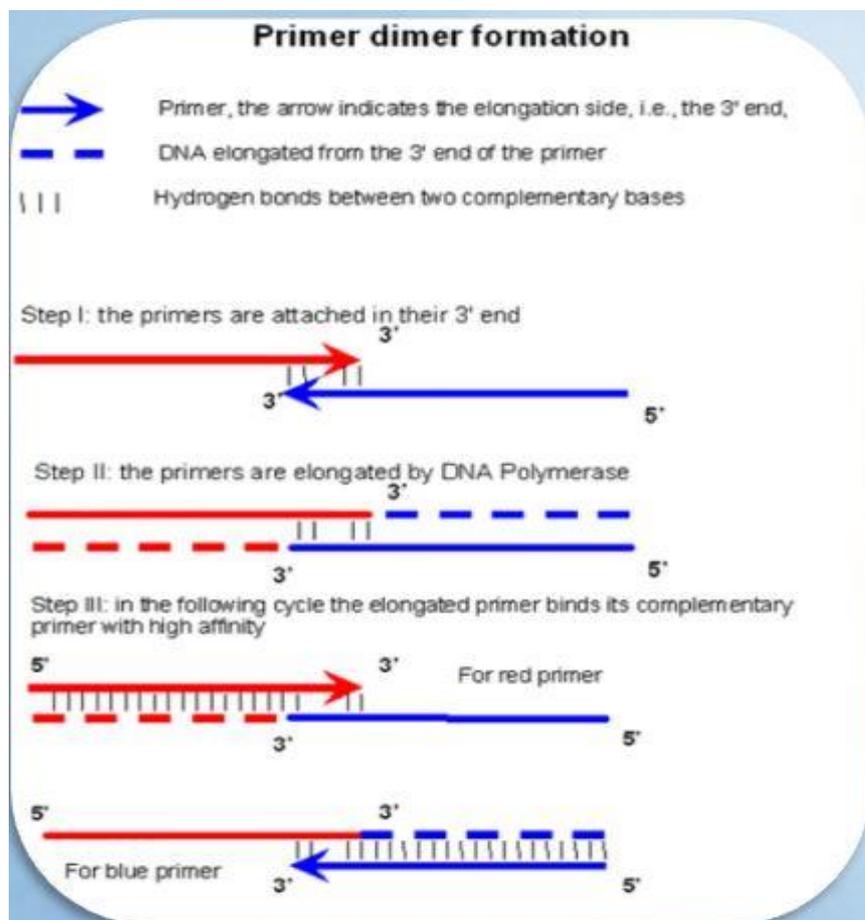


Figure 2.4. Formation de dimère d'amorce

2.1.4. Logiciels et base de donnée utilisé dans le travaille

2.1.4.1. NCBI

Le National Center for Biotechnology Information (NCBI, « Centre américain pour les informations biotechnologiques ») est un institut national américain pour l'information biologique moléculaire.

Cet organisme, fondé en 1988 et situé à Bethesda dans le Maryland, fait partie de la Bibliothèque américaine de médecine, un des Instituts américains de la santé.

Le NCBI conduit des recherches dans la biologie informatique, développe des logiciels pour analyser des données de génome et fournir des informations biomédicales.

Le NCBI n'est pas une base de données, mais il développe aussi des bases de données publiques telles que :

- GenBank
- dbSNP
- RefSeq
- PubMed.

2.1.4.1. Primer-BLAST

2.1.4.1.1. BLAST (acronyme de *basic local alignment search tool*) est une méthode de recherche heuristique utilisée en bioinformatique. Il permet de trouver les régions similaires entre deux ou plusieurs séquences de nucléotides ou d'acides aminés, et de réaliser un alignement de ces régions homologues.

Étant donné une séquence introduite par l'utilisateur, BLAST permet de retrouver rapidement dans des bases de données, les séquences répertoriées ayant des zones de similitude avec la séquence d'entrée. Cette méthode est utilisée pour trouver des relations fonctionnelles ou évolutives entre les séquences et peut aider à identifier les membres d'une même famille de gènes.

2.1.4.1.2. Primer Blast

Primer-BLAST Un outil pour trouver des amorces spécifiques. Recherche d'amorces spécifiques à notre modèle de PCR (en utilisant Primer3 et BLAST).

L'avantage d'utiliser Primer-BLAST pour concevoir des amorces de PCR en temps réel est que le logiciel BLAST a également la séquence d'amorce contre le génome de l'organisme d'intérêt. Cela signifie que le logiciel nous dira si les amorces sont susceptibles de se lier ailleurs dans le génome, ce qu'on veut évidemment éviter. On doit s'assurer que nos paires d'amorces sont spécifiques à notre cible.

2.1.4.2. Ensembl

Ensembl est un système bio-informatique d'annotation automatique de génomes. (Hubbard et al. 2007).

Pour chaque génome analysé, Ensembl tente d'identifier par un processus automatique l'ensemble des gènes qu'il contient. Il s'appuie pour cela sur des données de séquences existantes

(ARN, protéines), qu'il « raccroche » sur le génome, pour en déduire la structure des gènes. (Hubbard et al. 2007).

Sur cette première strate d'annotation, celle de la structure des gènes, Ensembl va ajouter d'autres éléments, parmi lesquels :

- Variations communes (polymorphismes) ;
- Éléments régulateurs des gènes ;
- Informations sur les protéines codées par les gènes ;
- Annotations externes, à travers le Distributed Annotation System (DAS)
- Gènes similaires d'autres organismes ;
- Maladies génétiques et syndromes cliniques.

(Hubbard et *al.* 2007)

2.2. Les étapes établies

2.2.1. Conception d'amorce pour le SNP Taq-1 (exon 9)

- ✓ On s'est rendu sur la base de données Ensembl (Figure 2.5) afin de sélectionner une séquence (exon 2, exon 9) du gène VDR
- Le snp Taq-1 est localisé au niveau de l'exon 9
- Le snp Fok-1 est localisé au niveau de l'exon 2

Chapitre 2. Matériels et méthodes

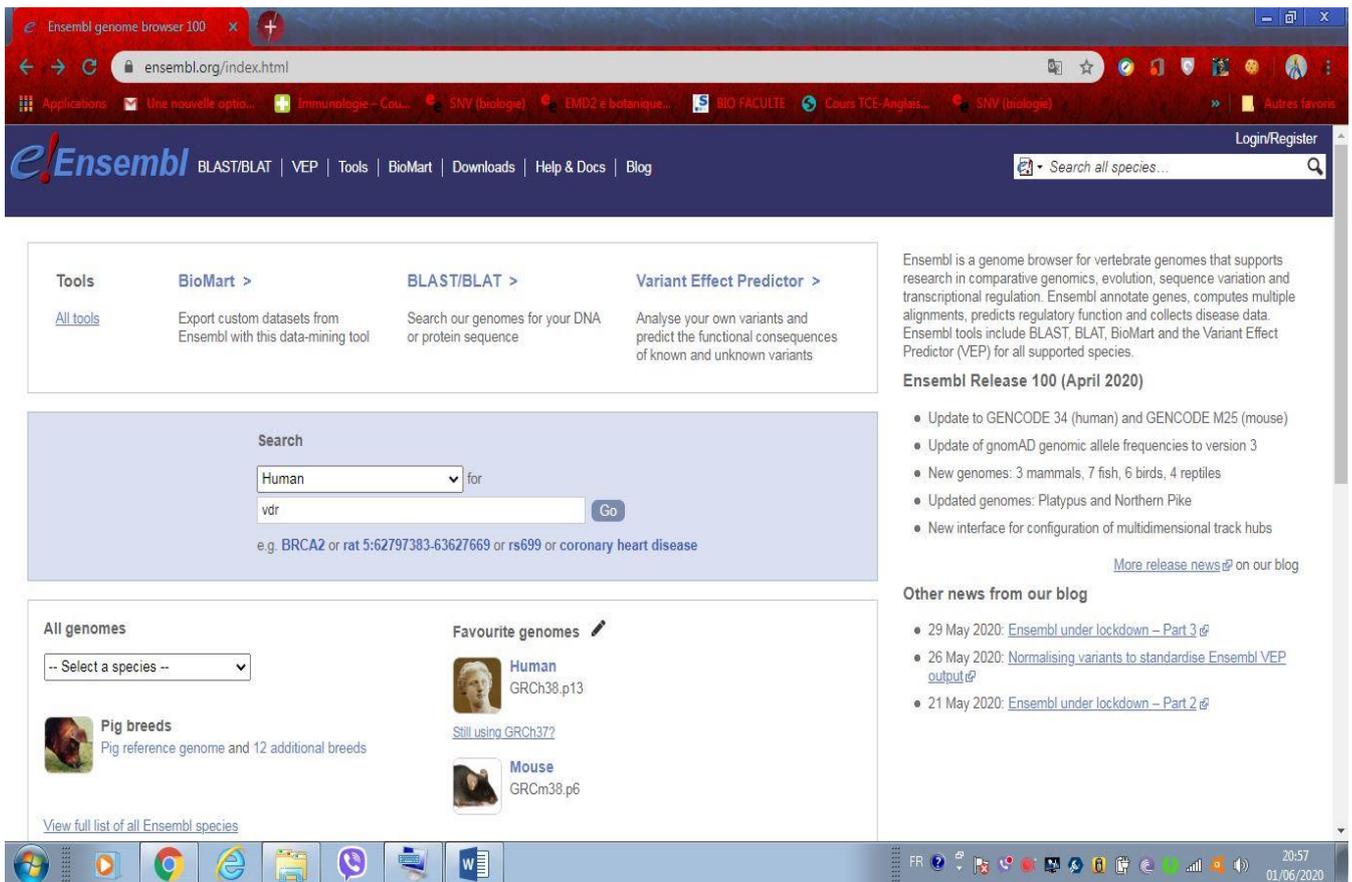


Figure 2.5. Plateforme de la base de données ensembl

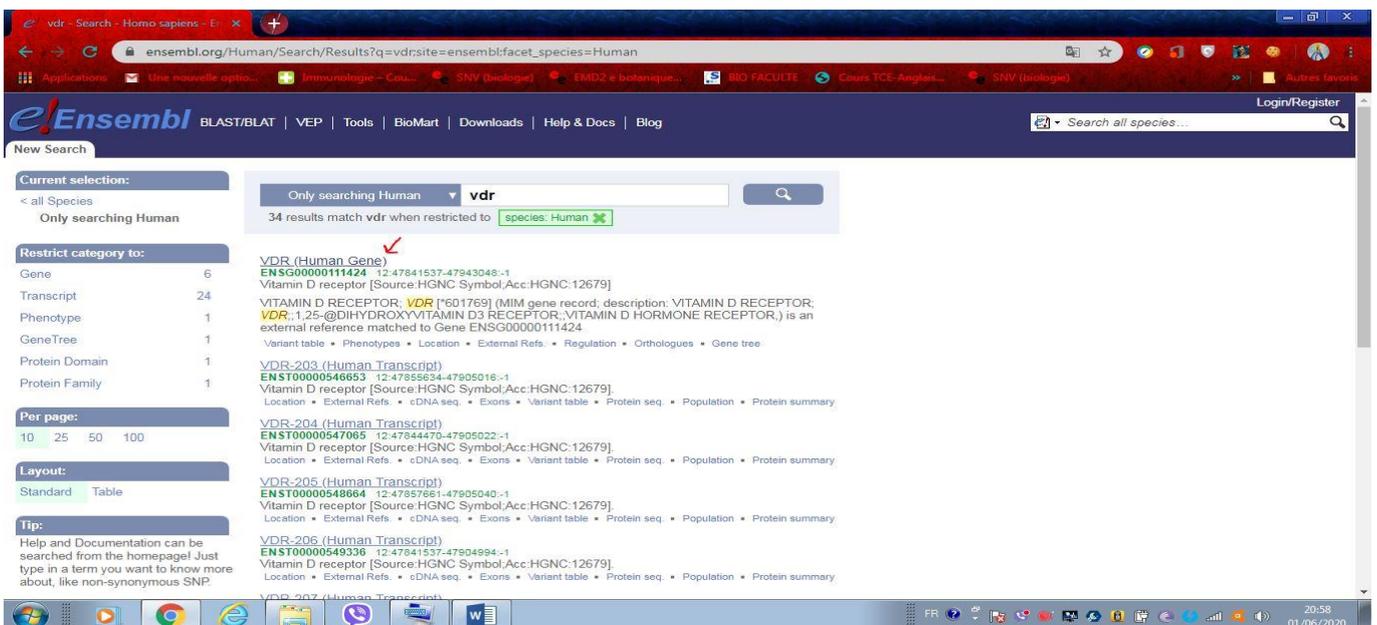


Figure 2.6. Etablissement de la recherche du gène VDR dans la plateforme ensembl

Chapitre 2. Matériels et méthodes

- ✓ La plateforme de la base de données montre où la séquence complète du gène peut être trouvée sous le code ENSG00000111424.12.(Figure 2.7)

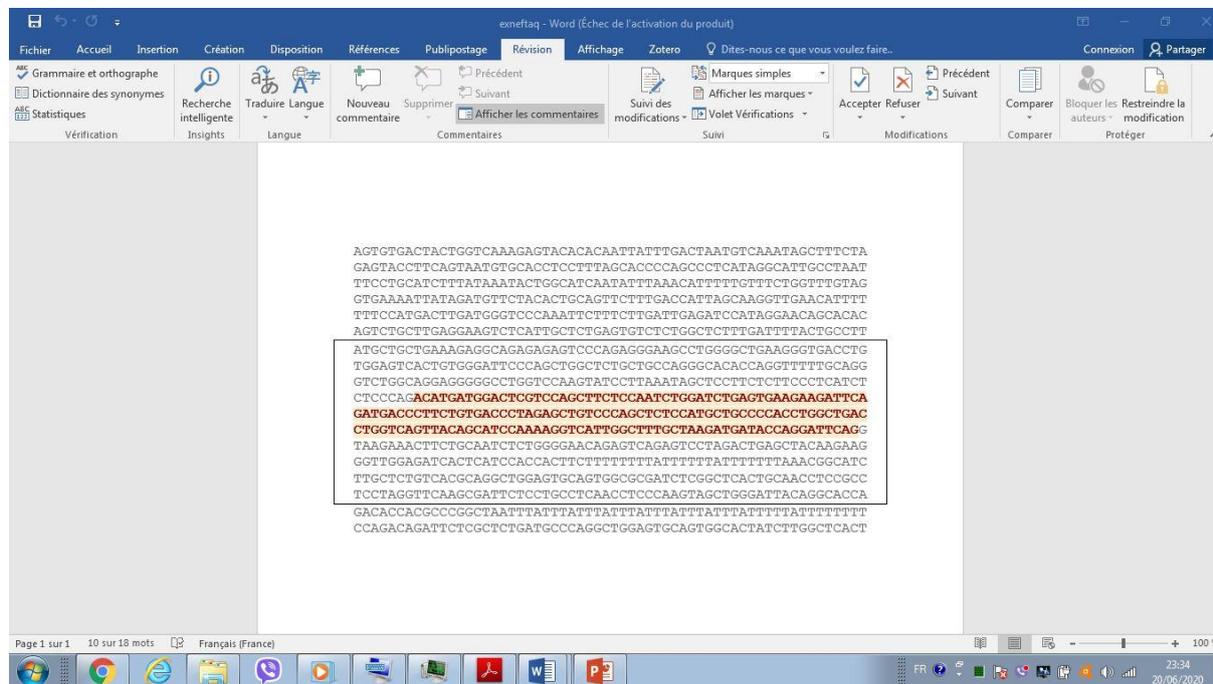
The screenshot shows the Ensembl genome browser interface for the gene VDR (ENSG00000111424.12). The browser address bar shows the URL: ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core:g=ENSG00000111424;r=12:47841537-47943048. The page title is "Gene: VDR ENSG00000111424". The main content area displays the following information:

- Description:** vitamin D receptor [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:12679]
- Gene Synonyms:** NR111, PPP1R163
- Location:** [Chromosome 12: 47,841,537-47,943,048](#) reverse strand. GRCh38:CM000674.2
- About this gene:** This gene has 8 transcripts ([splice variants](#)), [362 orthologues](#), [18 paralogues](#), is a member of [1 Ensembl protein family](#) and is associated with [4 phenotypes](#).
- Transcripts:** [Show transcript table](#)
- Summary:**
 - Name:** [VDR](#) (HGNC Symbol)
 - CCDS:** This gene is a member of the Human CCDS set: [CCDS55820.1](#), [CCDS8757.1](#)
 - UniProtKB:** This gene has proteins that correspond to the following UniProtKB identifiers: [P11473](#)
 - RefSeq:** This Ensembl/Gencode gene contains transcript(s) for which we have [selected identical RefSeq transcript\(s\)](#). If there are other RefSeq transcripts available they will be in the [External references](#) table
 - Ensembl version:** ENSG00000111424.12
 - Other assemblies:** This gene maps to [48,235,320-48,336,831](#) in GRCh37 coordinates. View this locus in the GRCh37 archive: [ENSG00000111424](#)
 - Gene type:** Protein coding
 - Annotation method:** Annotation for this gene includes both automatic annotation from Ensembl and Havana manual curation, see [article](#).

Figure 2.7 le code de la séquence complète du gène VDR sur la plateforme Ensembl

Chapitre 2. Matériels et méthodes

- ✓ Puis on récupère la séquence et on la met sur le word pour étaler la sélection. (Figure 2.9).



(A)



(B)

Figure 2.9. (A) et (B) correspond à Séquence du gène VDR prise depuis la base de données encadrant la partie qui nous intéressent (exon 9).

Chapitre 2. Matériels et méthodes

- ✓ on ouvre le site NCBI puis on se rend sur PRIMER BLAST.(Figure 2.)

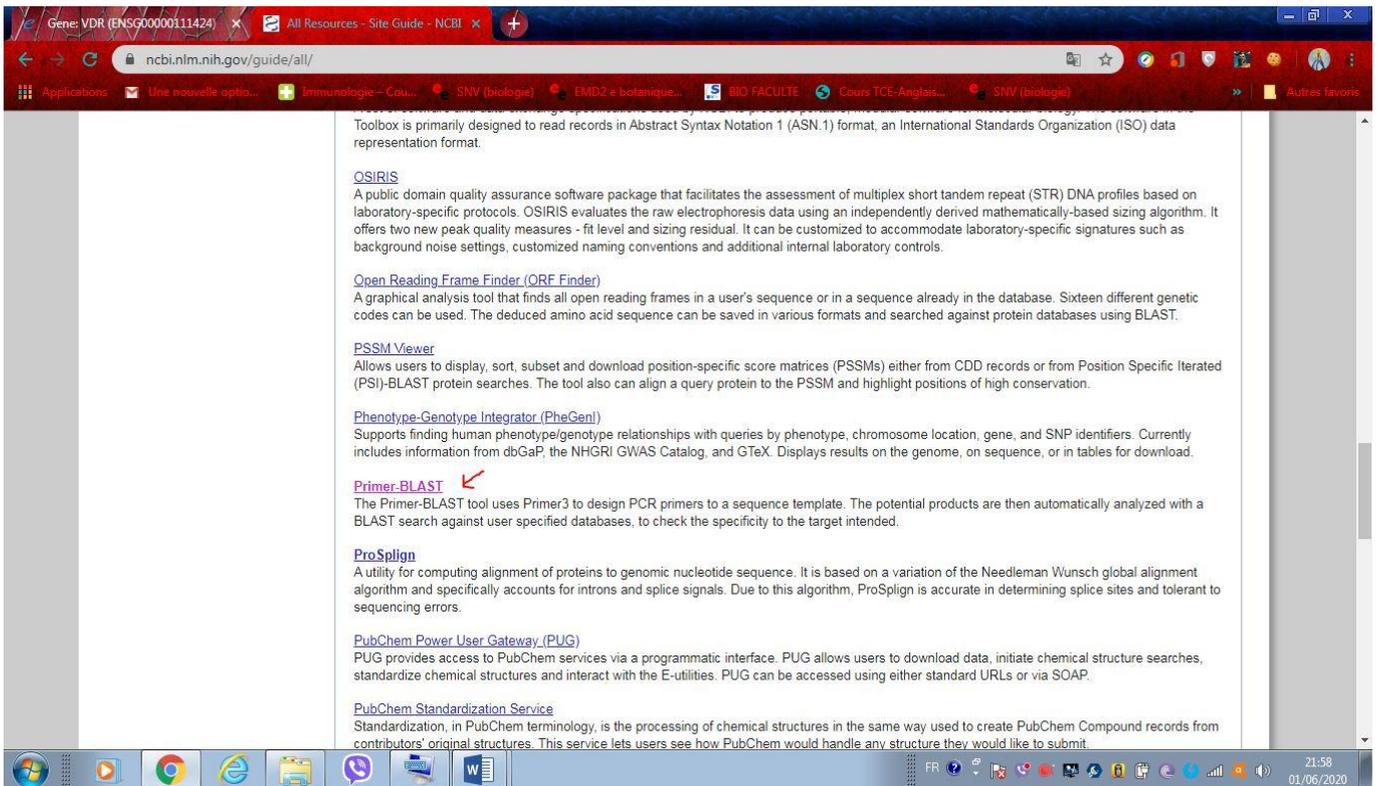


Figure 2.10. Primer Blast

- ✓ Par la suite on colle la séquence au niveau de PCR Template
- ✓ On définit aussi le FORWARD PRIMER et REVERSE PRIMER (Figure 2.11).

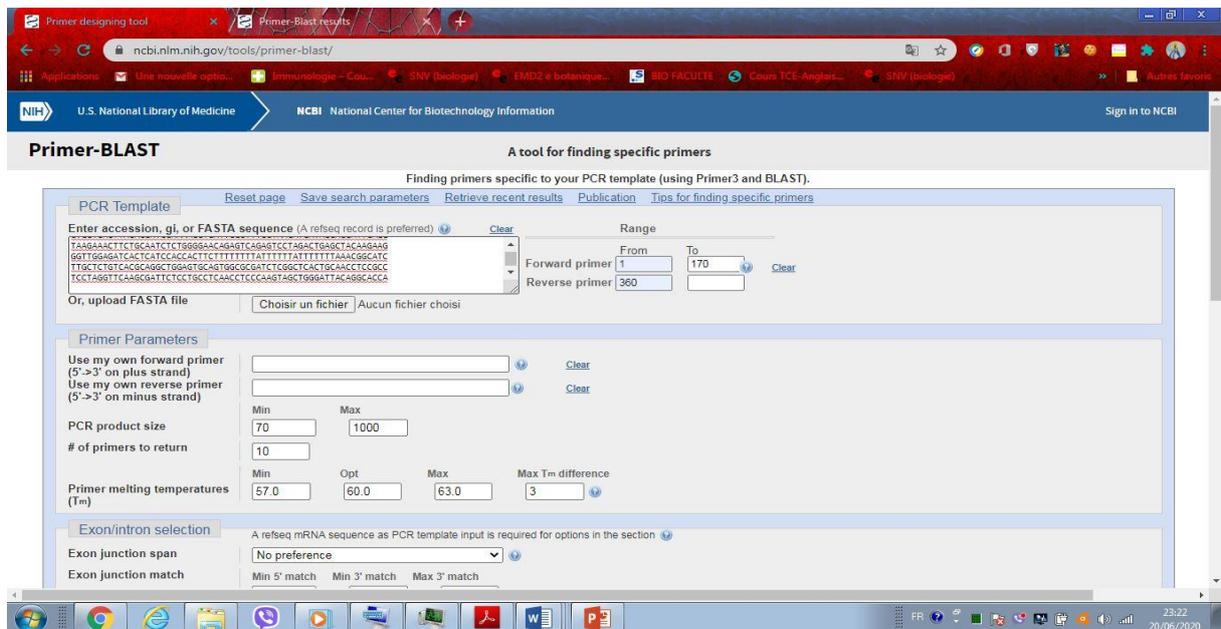


Figure 2.11. Définition de la séquence d'intérêt (snp Taq1) et le Forward primer, Reverse primer dans le Primer Blast

Chapitre 2. Matériels et méthodes

- ✓ On oublie pas de définir le Organism " homo sapiens et le Database " Genomes for selected organisms ".

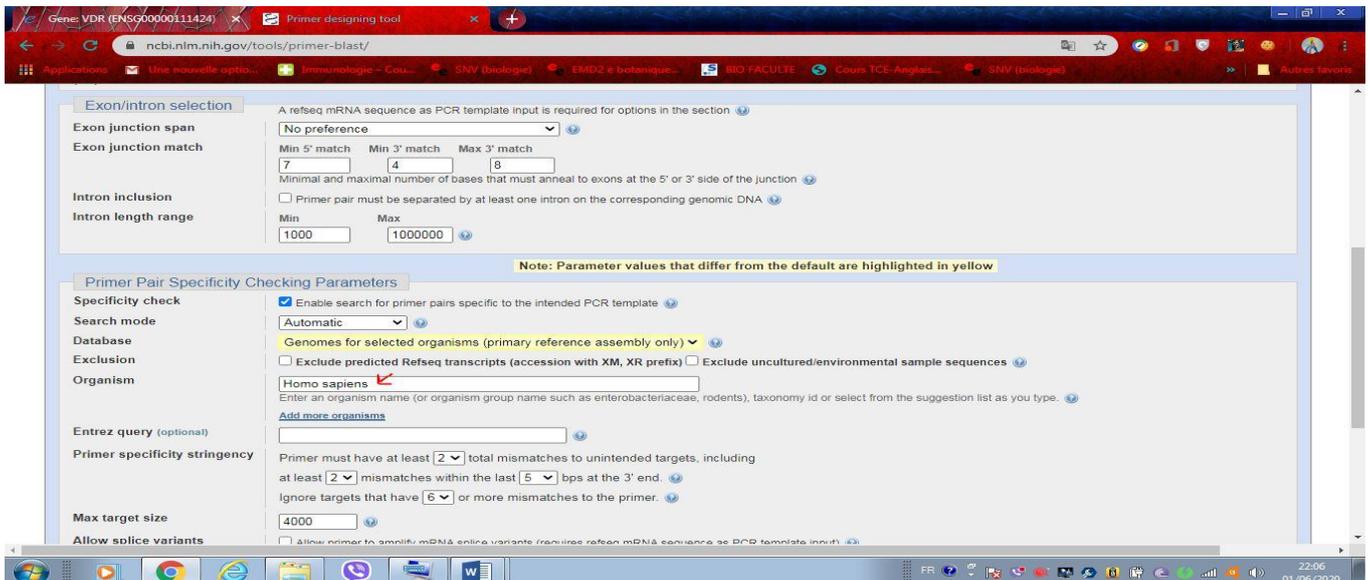


Figure 2.12. Définir le " Primer pair specificity checking parameters"

2.2.2. Conception d'amorce pour le SNP Fok-1 (exon 2)

- ✓ On a établie les même étapes d'avant (Figure 2.13) (Figure 2.14)

```
GTGCCTTGCCCTATGGACGACGGTTCGATGAAAATTTACGAGTTAGAGTATCTAAGGCTA
CAGCGTGGCCTATAGGGTGGTTGATTCCAAGTCAAGATGGTTGCAGCGCCAACGGAGCTC
CTGGCAAGAGAGGACTGGACCTGTGGCGGGGCGGAGGGGCGGGGCGGGGCCGGGGCGGG
GCCTGACCGAGAGGCCGGGGCCAGGTGCTGGGCTGTCTCTGCTTGTCAAAGCGGCAGCG
GAGCCGTGTGCGCCGGGAGCGCGGAACAGCTTGTCCACCCGCCGGCCGACAGGTGCGA
ACCCGGGAGCAGCGGAAAGGGGTCTCAGGATAGGGACTCGGGGTCTGGGGCGCTCTGGGA
TACCGGGGCTGAGCGCCCGCTGCGAGCATTAGAGTCTAAGTCTCAGCGGTAAACTTGG
CTACTGAGGTCCGGGCTGTCTGTCATGAGGCTGGGACACTAAGGGGCACTGAGGTTTGA
GAAAGCTGAAGTTCGTGCCAGGCTGGCGAGGGGAGCAGCGACATCCTCGGCGCTTAGGAG
AAATGCTCCGCTAACACAGTGCCTTAGCACTTGGGCAACAAGAAGTATTTGTTTCTTCTT
CTGTCTGGGGCGCCTTGGCATGGAGTGGAGGAATAAGAAAAGGAGCGATTGGCTGTCTGATG
GTGCTCAGAAGTGTGGAGTGGAGGTTGTGTAACCTTATTTATTTGTTTACAGGGCCAG
GTATGGTACCTGTGATGGTGGAGTTGGTCTTTTAAGTAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TTTTTTACTTTTCTTTGAACTACCAATGAGTTTAGACCTAATTGGCCCTATTTTTTTTCA
GGACAGCCTGTCAATAGATGTTTCAAGGAACTCAGGGGCAAGCATTAAATGAGGAAGGG
```

Figure 2.13. Séquence du gène VDR prise depuis la base de données encadrant la partie qui nous intéressent (exon 2).

Chapitre 2. Matériels et méthodes

The screenshot displays the NCBI Primer-BLAST web interface. The browser address bar shows the URL `ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/`. The page title is "Primer-BLAST" with the subtitle "A tool for finding specific primers". Below the title, it states "Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST)".

The interface is divided into several sections:

- PCR Template:** Contains a text area for the PCR template sequence. The sequence entered is:
GTGCTCAGAAGCTGCTGGAGTGGAGGGGTGTGAACCTTATTTATTGCTTACAGGGCCAG
GTATGGTCACCTGTGATGGTGGAGTTGGGCTTTAAGTAAATTTTTTTTTTTTTTTT
TTTTTTACTTTTCTTTGAACTCAACCAATGAGTTTGAAGCTAATTGGCCCTATTTTTTCA
GGACAGCCTGTCAATAGATGTTTCAGAGGAAGCTCAGGGGCAAGCATTTAAATGAGGAHGGG
Below the text area, there are fields for "Forward primer" (set to 1) and "Reverse primer" (set to 720). A "Range" section includes "From" and "To" fields.
- Primer Parameters:** Includes fields for "Use my own forward primer (5'→3' on plus strand)", "Use my own reverse primer (5'→3' on minus strand)", "PCR product size" (Min: 70, Max: 1000), "# of primers to return" (10), and "Primer melting temperatures (T_m)" (Min: 57.0, Opt: 60.0, Max: 63.0, Max T_m difference: 3).
- Exon/intron selection:** Includes "Exon junction span" (No preference) and "Exon junction match" (Min 5' match, Min 3' match, Max 3' match).

The Windows taskbar at the bottom shows the system clock as 23:08 on 20/06/2020.

Figure 2.14. Définition de la séquence d'intérêt (snp Fok 1) et le Forward primer, Reverse primer dans le Primer Blast

2.3. Confirmation des résultats

Afin de vérifier la fiabilité des amorces, in silico PCR (PCR virtuelle) doit être réalisée. Ceci s'effectue par un programme dans le site suivant : <https://genome.ucsc.edu/>.

- Si les amorces sont fiables, un seul résultat apparaît, en donnant la position sur le chromosome et la taille (on doit vérifier si ce sont les mêmes que notre gène). Si nous avons deux ou trois chromosomes, cela veut dire que nos amorces peuvent amplifier d'autres gènes, ce ne sont pas les bonnes.

CHAPITRE 3

Résultats

3.1. Résultat de la conception d'amorce pour l'exon 9 snp (Taq1)	59
3.2. Résultat de la conception d'amorce pour l'exon 2 snp (Fok1)	60
3.3. La PCR in silico	62

Chapitre 3. Résultats

3.1. Résultat de la conception d'amorce pour l'exon 9 snp (Taq1)

Sur la base de notre recherche d'amorces de PCR en temps réel pour le gène du récepteur VDR chez l'homme encadrant snp (Taq1).

J'ai 10 paires d'amorces potentielles parmi lesquelles choisir (Figure 3.1) :

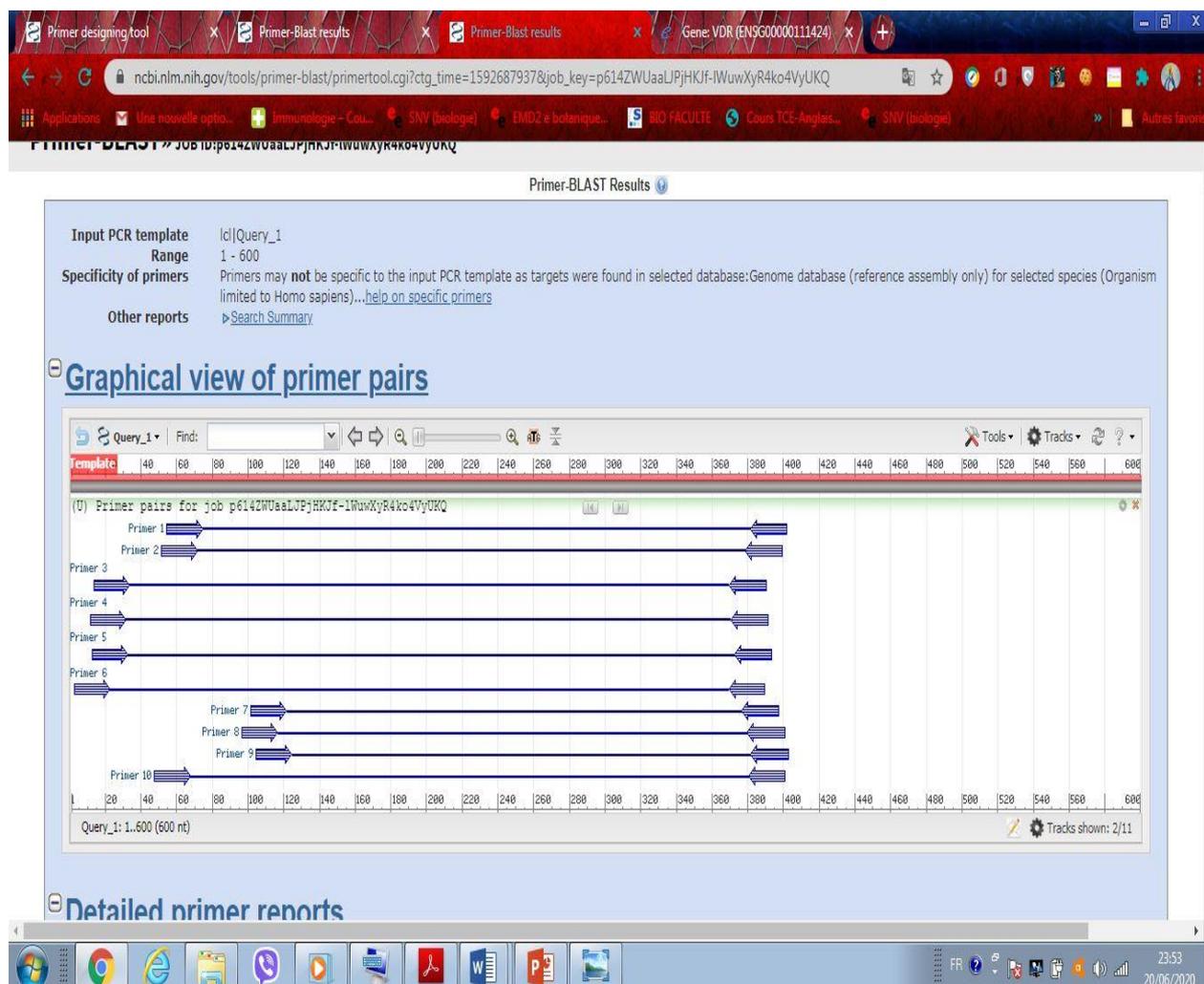


Figure 3.1. représente résultat graphique de la conception d'amorce de l'exon 9

En se basant sur c'est résultats (Figure 3.2) :

- Taille du produit PCR: 298 paires de bases.
- Longueur de l'amorce : 20 paires de bases l'autre 21
- GC% content: 50C l'autre 57.14%.
- Contient une pince GC : Les deux amorces contiennent une pince GC.
- Tm: 59.74 - 60,55 ° C (à 1 ° C près).
- Évitez les répétitions de nucléotides: Aucune répétition dans les amorces.

Chapitre 3. Résultats

- Les amorces s'étendent sur la jonction exon-exon et / ou les amorces sont séparées par un grand intron : l'intron de séparation est 1745, ce qui est assez grand.
- Faible score d'auto-complémentarité: les scores sont de 5,00 et 5,00. Ce sont assez élevés, mais j'ai vu des valeurs plus grandes fonctionner. Encore une fois, ce ne sont que des valeurs théoriques.
- Faible score de complémentarité de 3' : les scores sont de 1,00 et 0,00, donc il devrait y avoir un faible risque de formation d'amorce-dimère.

J'ai décidé de choisir la paire d'amorces 9 (Figure 3.2)

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ACCAGGTTTTGCAGGGTCT	Plus	20	105	124	59.74	50.00	5.00	1.00
Reverse primer	AGGACTCTGACTCTGTTCCCC	Minus	21	402	382	60.55	57.14	5.00	0.00
Product length	298								

Products on potentially unintended templates

>NC_000012.12 Homo sapiens chromosome 12, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 298
Features associated with this product:
[vitamin D3 receptor isoform VDRΔx](#)
[vitamin D3 receptor isoform X1](#)

Forward primer 1 ACCAGGTTTTGCAGGGTCT 20
Template 47855884 47855865

Reverse primer 1 AGGACTCTGACTCTGTTCCCC 21
Template 47855567 47855607

product length = 1009
Features flanking this product:
138779 bp at 5' side: [uncharacterized protein LOC105369914](#)
181376 bp at 3' side: [NADH dehydrogenase \[ubiquinone\] 1 alpha subcomplex subunit...](#)

Forward primer 1 ACCAGGTTTTGCAGGGTCT 20
Template 94790063 T.T..TG.....T. 94790044

Reverse primer 1 AGGACTCTGACTCTGTTCCCC 21
Template 94789055G...C.....G... 94789075

product length = 3753
Features associated with this product:
[thiopeptin reductase 1 cytoplasmic isoform 5](#)

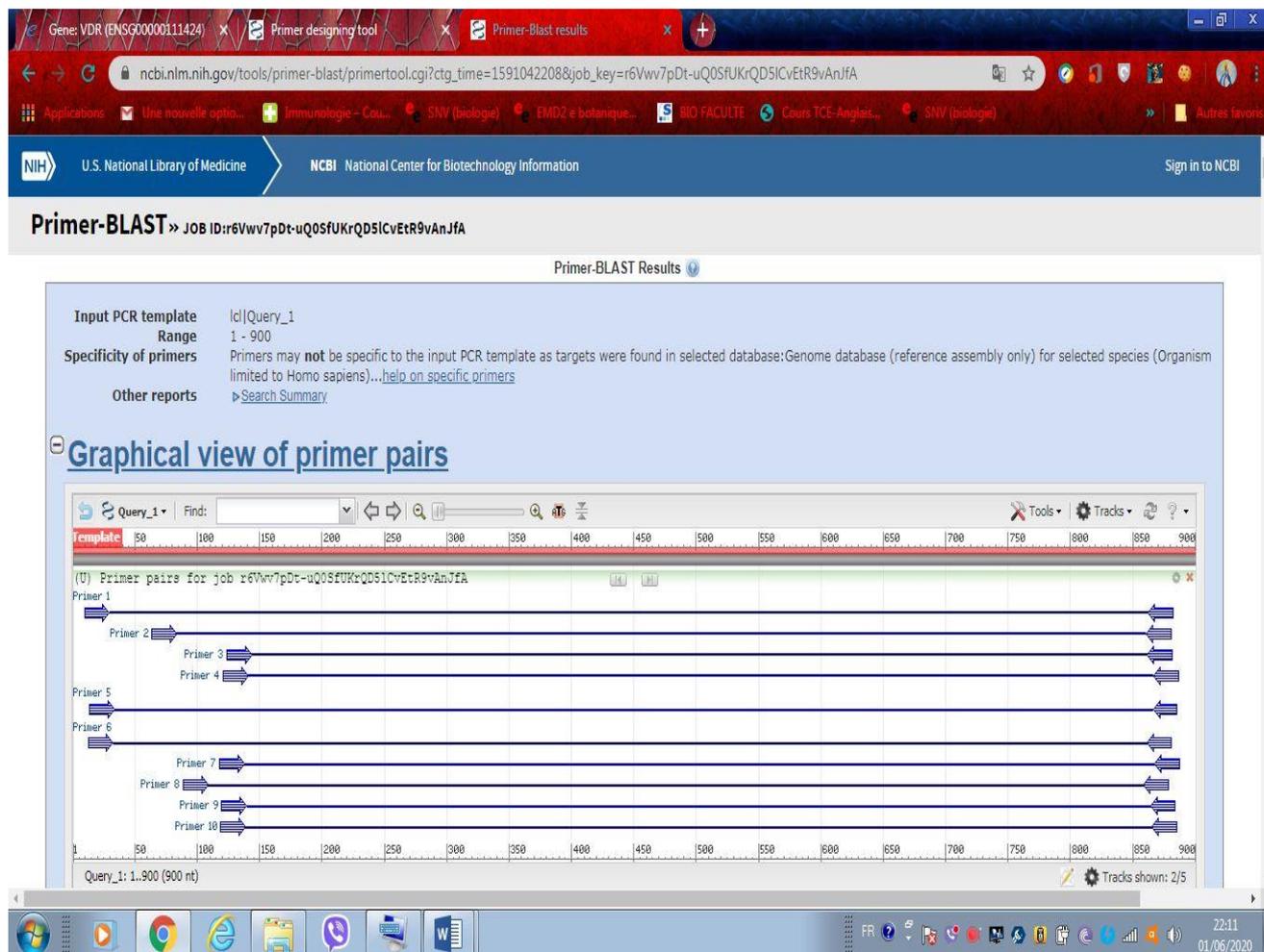
Figure 3.2. Résultat obtenu avec primer –blaste (exon 9)

3.2. Résultat de la conception d'amorce pour l'exon 2 snp (Fok1)

Sur la base de notre recherche d'amorces de PCR en temps réel pour le gène du récepteur VDR chez l'homme encadrant snp Fok1.

Chapitre 3. Résultats

J'ai 10 paires d'amorces potentielles parmi lesquelles choisir (Figure 3.3)



Quelle paire d'amorces devrais-je choisir?

Figure 3.3. résultat graphique de la conception d'amorce de l'exon 2

En se basant sur ces résultats (Figure 3.4) :

- Taille du produit PCR: 766 paires de bases.
- Longueur de l'amorce : 20 paires de bases chacune.
- GC% content: 60 % et l'autre 55 % .
- Contient une pince GC : Les deux amorces contiennent une pince GC.
- Tm: 59,75- 60,61° C.
- On Sélectionne les amorces qui se lient près de l'extrémité 3' du gène.
- Faible score d'auto-complémentarité: les scores sont de 4,00 et 3,00. Ce sont assez élevés, mais j'ai vu des valeurs plus grandes fonctionner.
- Faible score de complémentarité de 3' : les scores sont de 1,00 et 0,00, donc il devrait y avoir un faible risque de formation d'amorce-dimère.

Chapitre 3. Résultats

J'ai décidé de choisir la paire d'amorces 4 (Figure 3.4)

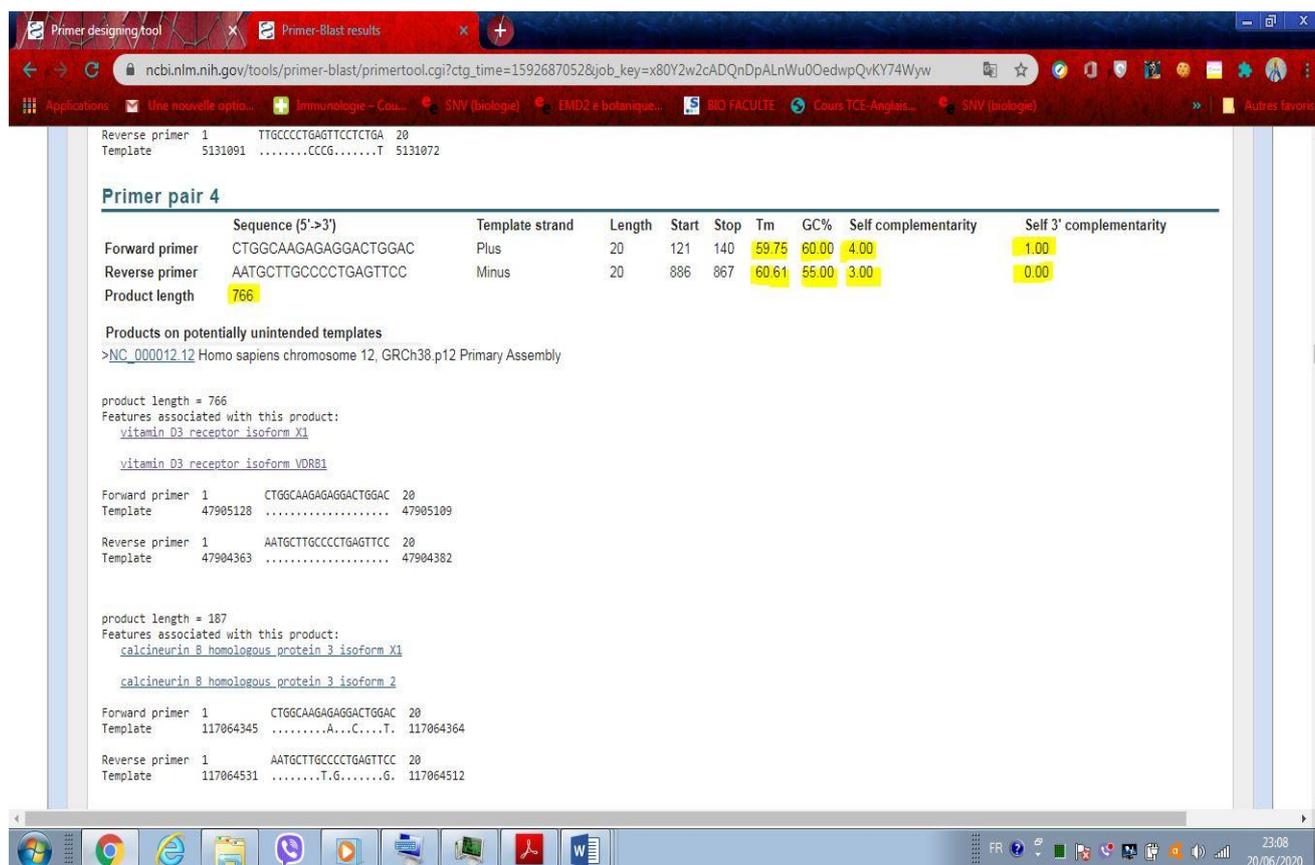


Figure 3.4. Résultat obtenu avec primer -blaste (exon 2)

3.3. La PCR *in silico*

La *PCR in silico* est un outil de bio-informatique utilisé pour simuler la PCR pour un ensemble d'amorces donné.

Cet outil est utilisé pour optimiser le design des sondes en fonction de l'ADN (ou l'ADNc) cible. L'optimisation des sondes à deux objectifs : l'efficacité et la sélectivité. L'efficacité est améliorée en prenant en compte des facteurs tels que la proportion de GC, l'efficacité de l'hybridation, la complémentarité, la structure secondaire des acides nucléiques, et le point de fusion (Tm) de l'ADN.

Donc à l'aide de cet outil on va vérifier la fiabilité des amorces obtenus.

3.3.1. Vérification de l'amorce 9 encadrant le SNP taq-1

UCSC In-Silico PCR nous donne les résultats suivant (Figure 3.5) :

- La position sur le chromosome : chr12:47855587-47855884

Chapitre 3. Résultats

- La taille de l'amorce 298bp
- La température de fusion

Forward: 60.9 C accaggttttgcagggtct

Reverse: 59.7 C aggactctgactctgttcccc

UCSC In-Silico PCR

>chr12:47855587-47855884 298bp ACCAGGTTTTGCAGGGTCT AGGACTCTGACTCTGTCCCC
ACCAGGTTTTGCAGGGTCTggcaggaggggctgtccaagtatcctt
aaatagctccttcttccctcatctctccagacatgatggactcgtcc
agcttccaatctggatctgagtgaagaagattcagatgaccttctgt
gacctagagctgtccagctctccatgctgccccacctggctgacctgg
tcagtacagcatccaaaaggtcattggcttctgaagatgataccagga
ttcaggtaagaaactctgcaatctctgGGGAACAGAGTCAGAGTCTCT

Primer Melting Temperatures

Forward: 60.9 C accaggttttgcagggtct
Reverse: 59.7 C aggactctgactctgttcccc
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](#).

Help

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

Figure 3.5. Vérification des résultats avec UCSC In-Silico PCR pour l'amorce 9

3.3.2. Vérification de l'amorce 4 encadrant le SNP Fok-1

UCSC In-Silico PCR nous donne les résultats suivant (Figure 3.6) :

- La position sur le chromosome : chr12:47904363-47905128
- La taille de l'amorce 766bp

- La température de fusion

Forward: 60.0 C ctggcaagagaggactggac

Reverse: 63.7 C aatgcttgcccctgagttcc

CHAPITRE 4

Discussion

Les études d'association génétique représentent une étape majeure dans la compréhension des mécanismes moléculaires, à l'origine des pathologies humaines. Ces études consistent à mettre en évidence d'éventuelles associations statistiquement significatives entre des variants génétiques et la survenue de certaines pathologies, dans notre cas c'est l'association entre le récepteur de la vitamine D et l'asthme allergique pédiatrique

Au cours des dernières années et sur la base de nombreuses recherches, quatre SNP dans le gène VDR, à savoir rs2228570 (FokI), rs731236 (TaqI), rs1544410 (BsmI) et rs7975232 (ApaI), ont été soupçonnés d'être des facteurs contribuant au risque d'asthme. (Makoui et al. 2020)

Ces résultats ont indiqué une association statistiquement significative entre les polymorphismes des gènes FokI et TaqI et le risque d'asthme, alors qu'il n'y avait aucune preuve de l'association entre BsmI et ApaI SNP avec risque d'asthme. (Makoui et al. 2020)

- Il a été rapporté que le polymorphisme FokI peut altérer le cordon de démarrage ATG dans le VDR et les changements dans la position rs1544410 peuvent fondamentalement moduler l'expression de la protéine VDR . (Makoui et al. 2020)
- De plus, il a été révélé que Les SNP ApaI ,TaqI influencent la transcription du gène ainsi que la stabilité de l'ARNm .(Makoui et al. 2020)
- il a été rapporté que SNP FokI pouvait interférer avec la transcription impliquée dans la régulation des gènes immuno-inflammatoires . (Makoui et al. 2020)

Du point de vue biologique

L'expression du récepteur VDR et sa concentration peuvent réguler les fonctions de la vitamine D. En conséquence les études en montré que l'altération de l'expression des protéines VDR, en raison de différents SNP, affectent la physiopathologie du foie (cirrhose) (40) et sur la couche épithéliale du poumon humain et les lymphocytes B et T ainsi que des troubles immunologiques et troubles du remodelage des voies respiratoires (41). En outre l'un de ces quatre SNP peut perturber la stabilité de l'ARNm du VDR, qui à son tour affecte les niveaux de protéines et modifie finalement l'équilibre de Th1 et Th2.(Makoui et al. 2020)

Chapitre 4. Discussion

Des données expérimentales suggèrent que la vitamine D et le VDR réduisent la production d'IL-12 et interféron (IFN) γ , qui provoquent la prédominance de la production de cytokines l'IL-4 et IL-13, au bénéfice du profil allergique. (Makoui et al. 2020)

Donc afin d'identifier Les SNP du gène du récepteur VDR impliqué dans la physiopathologie de l'asthme allergique pédiatrique On a besoin de :

- L'évaluation génotypique (génotypage) qui consiste à extraire l'ADN des présents dans les prélèvements). Une fois l'ADN extrait, le génotypage est effectué pour chacun des échantillons d'ADN afin de déterminer la présence ou l'absence des polymorphismes ciblés. Le génotypage repose sur l'amplification PCR (pour pofymerase chain reaction) qui, avec l'utilisation d'amorces spécifiques, permet d'amplifier la section d'ADN qui contient le polymorphisme d'intérêt. Ce fragment d'ADN amplifié permet ensuite la détection du polymorphisme au moyen de techniques variées..(KARINE TREMBLAY 2004)
- Le principe de la PCR repose sur l'utilisation de l'ADN polymérase, il s'agit d'une répllication in vitro de séquences spécifiques d'ADN. Cette méthode permet de générer à des dizaines de milliards d'exemplaires un fragment d'ADN particulier (la séquence d'intérêt, ADN d'intérêt ou ADN cible) à partir d'un extrait d'ADN (ADN matriciel). En effet, si la séquence d'intérêt est présente dans l'extrait d'ADN, il est possible de la répliquer sélectivement (on parle d'amplification) en très grande quantité. La puissance de la PCR repose sur le fait que la quantité d'ADN matriciel n'est pas, en théorie, un facteur limitant. On peut donc amplifier des séquences nucléotidiques à partir de quantités infinitésimales d'extrait d'ADN.

Ici, nous avons fait

- la conception D'amorces (primers) encadrant snp du gène VDR pour parvenir à amplifier sélectivement des séquences nucléotidiques à partir d'un extrait d'ADN par PCR, il est indispensable de disposer d'au moins d'une paire d'oligonucléotides. Ces oligonucléotides, qui vont servir d'amorces pour la répllication, sont synthétisés par voie chimique et doivent montrer la meilleure complémentarité possible avec les deux extrémités de la séquence d'intérêt que l'on souhaite amplifier. L'une des amorces est conçue pour reconnaître par complémentarité une séquence située en amont du brin 5'-3' du fragment d'ADN d'intérêt ; l'autre pour reconnaître, toujours par complémentarité, une séquence située en amont du brin complémentaire (3'-5') du même fragment d'ADN. Les amorces sont des ADN monocaténaire dont l'hybridation

sur les séquences flanquant la séquence d'intérêt permettra sa répllication de façon sélective. La taille des amorces est généralement comprise entre 10 et 30 nucléotides afin de garantir une hybridation suffisamment spécifique sur les séquences d'intérêt de l'ADN matriciel. D'autres critères, importants mais secondaires par rapport aux précédents, doivent être pris en compte pour la conception et l'emploi des amorces. La séquence des amorces doit comporter la plus grande proportion possible de guanines et de cytosines. En effet, la liaison entre guanines et cytosines est assurée par trois liaisons hydrogène au lieu de deux entre les adénines et les thymines, ce qui se traduit par une meilleure stabilité de la liaison au moment de l'hybridation des amorces. Plus les amorces sont riches en cytosines et guanines, plus leur température d'hybridation (T_m) peut être élevée (elle est en général comprise entre 40 et 65°C, mais peut atteindre 70°C) plus la spécificité est optimale.

CHAPITRE 5

Conclusion et perspectives

3.1. Conclusion et perspectives

Notre étude bibliographique a été dirigée dans le premier chapitre sur la relation entre le polymorphisme du gène VDR dans l'asthme allergique pédiatrique et a l'importance d'élaborer des amorces spécifiques pour pouvoir génotyper et étudier plus profondément l'association génétique entre ces SNP et l'asthme allergique pédiatrique.

Dans notre étude pratique, d'une façon générale, les bonnes amorces doivent avoir

- ✓ une longueur de 16–30 nucléotides, ce qui autorise une température d'hybridation raisonnablement élevée.
- ✓ Les amorces doivent être exemptes de suites de séquences de polybases (poly-dG, par exemple) ou de motifs répétitifs, ceux-ci pouvant s'hybrider de manière inadéquate avec la matrice. Il convient d'éviter les séquences répétées inversées afin d'empêcher la formation de structures secondaires dans l'amorce, ce qui empêcherait l'hybridation avec la matrice.
- ✓ Les séquences complémentaires d'autres amorces utilisées dans la PCR devraient également être évitées afin d'empêcher l'hybridation entre amorces ou la formation de dimères d'amorce (particulièrement important pour l'extrémité 3' de l'amorce). Si possible, l'extrémité 3' de l'amorce devrait être riche en bases de G et C pour une meilleure hybridation de l'extrémité qui sera étendue. La distance entre les amorces devrait être inférieure à 10 Kb.
- ✓ En général, on observe une réduction substantielle du rendement lorsque les amorces sont distantes de plus de 3 Kb environ. Des oligonucléotides sont généralement utilisés à la concentration de 1 μ M dans la PCR, ce qui est suffisant pour au moins 30 cycles d'amplification.
- ✓ Une concentration plus élevée d'oligonucléotides peut entraîner l'amplification de séquences non cibles indésirables. Inversement, la PCR est inefficace lorsque la concentration d'amorce est trop faible.

Dans ce travail nous avons réussi à élaborer et à définir, les séquences des oligonucléotides qui serviront d'amorces à l'amplification par réaction de polymérisation en chaîne PCR, du fragment encadrant le SNP (Fok1, Taq1) du gène VDR afin de pouvoir réaliser par la suite, des études d'association génétique impliquant le polymorphisme (Fok1, Taq1).

Chapitre 5 : Conclusion et perspectives

En terme de perspectives

On peut

- ✓ S'intéressé en particulier à l'identification des ressemblances entre les séquences, à l'identification des gènes ou de régions biologiquement pertinentes dans l'ADN ou dans les protéines, en se basant sur l'enchaînement ou *séquence* de leurs composants élémentaires (nucléotides, acides aminés).

La PCR est très couramment utilisée dans de nombreux domaines

En médecine

- Pour diagnostiquer des maladies génétiques (myopathie, mucoviscidose), des infections virales (SIDA, Hépatite C, SRAS), bactériennes (tuberculose) ou parasitaires (toxoplasmose), mais aussi des cancers

En médecine légale

- Pour identifier une personne par son empreinte génétique dans le cadre d'une enquête judiciaire
- Pour un test de paternité.

En agroalimentaire

- Pour identifier des variétés ou des espèces végétales et animales, pour sélectionner de nouvelles variétés de fruits et légumes, comme la tomate
- Pour le contrôle de la qualité des produits agroalimentaires, détecter la présence d'OGM dans un aliment par exemple.

En histoire

- Pour des études phylogénétiques sur des squelettes fossiles (ADN fossile), rechercher les liens de parenté entre les individus
- Pour l'étude des migrations des populations humaines et animales
- Pour la détection d'infections virales, bactériennes et parasitaires sur des momies égyptiennes et andines

Les résultats de ce modeste travail constituent les bases d'un travail à poursuivre et à améliorer pour une étude beaucoup plus approfondie qui pourra faire l'objet d'une thèse de doctorat.

Chapitre 6 Bibliographie

A

Adorini, Luciano. 2005. « Intervention in Autoimmunity: The Potential of Vitamin D Receptor Agonists ». *Cellular Immunology* 233 (2): 115-24. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2005.04.013>.

Ahmed, Husam, et Steve Turner. 2019. « Severe Asthma in Children—a Review of Definitions, Epidemiology, and Treatment Options in 2019 ». *Pediatric Pulmonology* 54 (6): 778-87. <https://doi.org/10.1002/ppul.24317>.

Ashktorab, Hassan, Bijou Nguza, Mehrnaz Fatemi, Mehdi Nouraie, Duane T. Smoot, Alejandro A. Schäffer, Sonia S. Kupfer, Carlos A. Camargo, et Hassan Brim. 2011. « Case-Control Study of Vitamin D, Dickkopf Homolog 1 (DKK1) Gene Methylation, VDR Gene Polymorphism and the Risk of Colon Adenoma in African Americans ». *PloS One* 6 (10): e25314. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025314>.

B

Bacchetta, J. 2019. « Vitamine D en pédiatrie ». *Journal de Pédiatrie et de Puériculture* 32 (6): 310-21. <https://doi.org/10.1016/j.jpp.2019.09.004>.

Bellaïche, Marc, et Aurélie Pham. 2017. *Pédiatrie*.

Bikle, Daniel D. 2011. « Vitamin D Regulation of Immune Function ». *Vitamins and Hormones* 86: 1-21. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386960-9.00001-0>.

Brown, A. J., M. Zhong, J. Finch, C. Ritter, et E. Slatopolsky. 1995. « The Roles of Calcium and 1,25-Dihydroxyvitamin D3 in the Regulation of Vitamin D Receptor Expression by Rat Parathyroid Glands ». *Endocrinology* 136 (4): 1419-25. <https://doi.org/10.1210/endo.136.4.7895652>.

D

Dutau, G., et F. Lavaud. 2012. « Vitamine D, immunité, asthme et symptômes d'atopie ». *Revue Française d'Allergologie* 52 (octobre): S10-18. [https://doi.org/10.1016/S1877-0320\(12\)70038-6](https://doi.org/10.1016/S1877-0320(12)70038-6). 2016. « Diagnostic et prise en charge de l'asthme chez les enfants âgés de 5 ans et moins. Mise à jour 2015 du Global Initiative for Asthma (GINA) ». *Revue Française d'Allergologie* 56 (7-8): 573-78. <https://doi.org/10.1016/j.reval.2016.09.001>.

Chapitre 4 : Bibliographie

E

Egan, Jan B., Patricia A. Thompson, Milen V. Vitanov, Leonid Bartik, Elizabeth T. Jacobs, Mark R. Haussler, Eugene W. Gerner, et Peter W. Jurutka. 2010. « Vitamin D Receptor Ligands, Adenomatous Polyposis Coli, and the Vitamin D Receptor FokI Polymorphism Collectively Modulate Beta-Catenin Activity in Colon Cancer Cells ». *Molecular Carcinogenesis* 49 (4): 337-52. <https://doi.org/10.1002/mc.20603>.

F

Faraco, J. H., N. A. Morrison, A. Baker, J. Shine, et P. M. Frossard. 1989. « Apal Dimorphism at the Human Vitamin D Receptor Gene Locus ». *Nucleic Acids Research* 17 (5): 2150. <https://doi.org/10.1093/nar/17.5.2150>.

G

Gauzzi, Maria Cristina, Cristina Purificato, Karim Donato, Yixin Jin, Ling Wang, Kenn C. Daniel, Azzam A. Maghazachi, Filippo Belardelli, Luciano Adorini, et Sandra Gessani. 2005. « Suppressive Effect of 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 on Type I IFN-Mediated Monocyte Differentiation into Dendritic Cells: Impairment of Functional Activities and Chemotaxis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174 (1): 270-76. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.1.270>.

Global Initiative for Asthma. 2020. « Global Asthma Initiative. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2020 ». www.ginasthma.org.

Gupta, Atul, Alies Sjoukes, David Richards, Winston Banya, Catherine Hawrylowicz, Andrew Bush, et Sejal Saglani. 2011. « Relationship between Serum Vitamin D, Disease Severity, and Airway Remodeling in Children with Asthma ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 184 (12): 1342-49. <https://doi.org/10.1164/rccm.201107-1239OC>.

H

Haktanir Abul, Mehtap, et Wanda Phipatanakul. 2019. « Severe Asthma in Children: Evaluation and Management ». *Allergology International* 68 (2): 150-57. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2018.11.007>.

Hall, Sannette C., et Devendra K. Agrawal. 2017. « Vitamin D and Bronchial Asthma: An Overview of Data From the Past 5 Years ». *Clinical Therapeutics* 39 (5): 917-29. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2017.04.002>.

Harju, Maijakaisa, Leea Keski-Nisula, Leena Georgiadis, et Seppo Heinonen. 2016. « Parental Smoking and Cessation during Pregnancy and the Risk of Childhood Asthma ». *BMC Public Health* 16: 428. <https://doi.org/10.1186/s12889-016-3029-6>.

Chapitre 4 : Bibliographie

Haussler, Mark R., Carol A. Haussler, Leonid Bartik, G. Kerr Whitfield, Jui-Cheng Hsieh, Stephanie Slater, et Peter W. Jurutka. 2008. « Vitamin D Receptor: Molecular Signaling and Actions of Nutritional Ligands in Disease Prevention ». *Nutrition Reviews* 66 (10 Suppl 2): S98-112. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2008.00093.x>.

Heederik, Dick, et Erika von Mutius. 2012. « Does Diversity of Environmental Microbial Exposure Matter for the Occurrence of Allergy and Asthma? » *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 130 (1): 44-50. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.01.067>.

Hewison, Martin. 2011. « Vitamin D and Innate and Adaptive Immunity ». *Vitamins and Hormones* 86: 23-62. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386960-9.00002-2>.

Holgate, Stephen T. 2008. « Pathogenesis of Asthma ». *Clinical and Experimental Allergy*, 26.

Hubbard, T. J. P., B. L. Aken, K. Beal, B. Ballester, M. Caccamo, Y. Chen, L. Clarke, et al. 2007. « Ensembl 2007 ». *Nucleic Acids Research* 35 (Database issue): D610-617. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl996>.

Huet, Tiphaine. 2011. « EXPLOITATION DE LA RELATION STRUCTURE-FONCTION DU RÉCEPTEUR NUCLÉAIRE DE LA VITAMINE D POUR L'ÉLUCIDATION DES MÉCANISMES DE LA SIGNALISATION DE LA VITAMINE D. », 130.

J

Jat, KanaRam, et Anju Khairwa. 2017. « Vitamin D and Asthma in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies ». *Lung India* 34 (4): 355. <https://doi.org/10.4103/0970-2113.209227>.

K

KARINE TREMBLAY. 2004. « ETUDE D'ASSOCIATION ENTRE CERTAINS GENES CANDIDATS ET L'ASTHME DANS UNE COHORTE FAMILIALE ORIGINAIRE DU SAGUENAY-LAC-SAINT-JEAN : Réflexion sur l'analyse d'interaction gène-gène ». FACULTE DE MEDECINE UNIVERSITÉ LAVAL QUÉBEC: 'Université Laval.

Kilic, Mehmet, Sema Ecin, Erdal Taskin, Askin Sen, et Murat Kara. 2019. « The Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms in Asthmatic Children: A Case-Control Study ». *Pediatric Allergy, Immunology, and Pulmonology* 32 (2): 63-69. <https://doi.org/10.1089/ped.2018.0948>.

Köstner, Kim, Nicole Denzer, Cornelia S. L. Müller, Rolf Klein, Wolfgang Tilgen, et Jörg Reichrath. 2009. « The Relevance of Vitamin D Receptor (VDR) Gene Polymorphisms for Cancer: A Review of the Literature ». *Anticancer Research* 29 (9): 3511-36.

Kroner, Juliana, Andrea Sommer, et Mario Fabri. 2015. « Vitamin D Every Day to Keep the Infection Away? » *Nutrients* 7 (6): 4170-88. <https://doi.org/10.3390/nu7064170>.

L

Landrier, Jean-François. 2014. « Vitamine D : sources, métabolisme et mécanismes d'action ». *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 49 (6): 245-51. <https://doi.org/10.1016/j.cnd.2014.07.008>.

Leiter, Katharine, Kimberley Franks, Meredith L Borland, Laura Coleman, Leesa Harris, Peter N. Le Souëf, et Ingrid A. Laing. 2020. « Vitamin D Receptor Polymorphisms Are Associated with Severity of Wheezing Illnesses and Asthma Exacerbations in Children ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 201 (juillet): 105692. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105692>.

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).

M

Mackawy, Amal M. H., et Mohammed E. H. Badawi. 2014. « Association of Vitamin D and Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms with Chronic Inflammation, Insulin Resistance and Metabolic Syndrome Components in Type 2 Diabetic Egyptian Patients ». *Meta Gene* 2 (décembre): 540-56. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2014.07.002>.

Makoui, Masoud Hassanzadeh, Danyal Imani, Morteza Motallebnezhad, Maryam Azimi, et Bahman Razi. 2020. « Vitamin D Receptor Gene Polymorphism and Susceptibility to Asthma ». *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 124 (1): 57-69. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2019.10.014>.

Masuyama, H., et P. N. MacDonald. 1998. « Proteasome-Mediated Degradation of the Vitamin D Receptor (VDR) and a Putative Role for SUG1 Interaction with the AF-2 Domain of VDR ». *Journal of Cellular Biochemistry* 71 (3): 429-40.

Mohapatra, Sudhesna, Alpana Saxena, Gauri Gandhi, Bidhan Chandra Koner, et Prakash Chandra Ray. 2013. « Vitamin D and VDR Gene Polymorphism (FokI) in Epithelial Ovarian Cancer in Indian Population ». *Journal of Ovarian Research* 6 (1): 37. <https://doi.org/10.1186/1757-2215-6-37>.

Molin, Arnaud. 2019. « Etude des causes génétiques de dérégulation du métabolisme de la vitamine D », 182.

N

Nemere, Ilka, Natalio Garbi, Gunter J. Hämmerling, et Ramesh C. Khanal. 2010. « Intestinal Cell Calcium Uptake and the Targeted Knockout of the 1,25D3-MARRS (Membrane-

Chapitre 4 : Bibliographie

Associated, Rapid Response Steroid-Binding) Receptor/PDIA3/Erp57 ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (41): 31859-66. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.116954>.

P

Pedersen, Ayako Wakatsuki, Mogens Helweg Claesson, et Mai-Britt Zocca. 2011. « Dendritic Cells Modified by Vitamin D: Future Immunotherapy for Autoimmune Diseases ». *Vitamins and Hormones* 86: 63-82. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386960-9.00003-4>.

R

REDOUANE TELLAA. 2013. « APPORT DE LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE DANS LE DIAGNOSTIC DES INFECTIONS FONGIQUES INVASIVES REVUE DE LA LITTÉRATURE ». UNIVERSITE MOHAMMED V –SOUISSI– FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE –RABAT.
<http://ao.um5.ac.ma/xmlui/bitstream/handle/123456789/1083/P0252013.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Rosa, Maria José, Alison G. Lee, et Rosalind J. Wright. 2018. « Evidence Establishing a Link between Prenatal and Early-Life Stress and Asthma Development ». *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 18 (2): 148-58.
<https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000421>.

S

Salimi, Saeedeh, Farzaneh Farajian-Mashhadi, Roya Alavi-Naini, Golbarg Talebian, et Mehrnaz Narooie-Nejad. 2015. « Association between Vitamin D Receptor Polymorphisms and Haplotypes with Pulmonary Tuberculosis ». *Biomedical Reports* 3 (2): 189-94.
<https://doi.org/10.3892/br.2014.402>.

Selma, Choual, et Bousoufi Habiba. 2017. « Evaluation du taux de vitamine D dans une population diabétique dans la région de Miliana », 82.

Smati-Bourtrel, Pr L, et Pr Z Arrada. 2010. « Secrétaire Général : Dr. K. BERKOUK », 104.

Souberbielle, J C. 2011. « Effets classiques et non classiques de la vitamine D ». *Correspondances en Métabolismes Hormones Diabètes et Nutrition*, 5.

Stern, Jessica, Jennifer Pier, et Augusto A. Litonjua. 2020. « Asthma Epidemiology and Risk Factors ». *Seminars in Immunopathology* 42 (1): 5-15. <https://doi.org/10.1007/s00281-020-00785-1>.

U

Uitterlinden, André G., Yue Fang, Joyce B. J. van Meurs, Hans van Leeuwen, et Huibert A. P. Pols. 2004. « Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms in Relation to Vitamin D Related

Chapitre 4 : Bibliographie

Disease States ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 89-90 (1-5): 187-93. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.03.083>.

Uitterlinden, André G., Yue Fang, Joyce B. J. Van Meurs, Huibert A. P. Pols, et Johannes P. T. M. Van Leeuwen. 2004. « Genetics and Biology of Vitamin D Receptor Polymorphisms ». *Gene* 338 (2): 143-56. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.05.014>.

V

Viard, J.-P. 2015. « Vitamine D et pathologies infectieuses ». *Médecine Nucléaire* 39 (5): 430-34. <https://doi.org/10.1016/j.mednuc.2015.07.002>.

Y

Yurt, Methap, Jie Liu, Reiko Sakurai, Ming Gong, Sumair M. Husain, Mohammed A. Siddiqui, Maleha Husain, et al. 2014. « Vitamin D Supplementation Blocks Pulmonary Structural and Functional Changes in a Rat Model of Perinatal Vitamin D Deficiency ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 307 (11): L859-867. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00032.2014>.

Z

Zarogoulidis, Paul, Konstantinos Porpodis, Kalliopi Domvri, Efi Milonaki, Stella Primikiri, Alina Gouleka, Antonis Papaiwannou, et al. 2013. « Vitamin D in Asthma and Future Perspectives ». *Drug Design, Development and Therapy*, septembre, 1003. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S50599>.