



# Polymorphisme des gènes des cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ et IL6), de l'IL1Ra et du MCP-1 dans la population algérienne asthmatique monosensibilisée au Der p1.

L. BERKANI<sup>1</sup>, M. GHARNAOUT<sup>2,4</sup>, A. BENYOUNES<sup>3</sup>, H. DOUAGUI<sup>4</sup>, M.C. ABBADI<sup>5</sup>, D. CHARRON<sup>6</sup>, R. TAMOUZA<sup>6</sup>, M. GHAFFOR<sup>7</sup>, R. DJIDJIK<sup>1,7</sup>

- 1.Laboratoire d'Immunologie, CHU Béni-Messous, Alger, Algérie.
- 2.Service de Pneumologie, de Phtisiologie et d'Allergologie, EPH Rouiba, Alger, Algérie.
- 3.Centre d'Allergologie, Ben-Aknoun, Alger, Algérie.
- 4.Service de Pneumo- Allergologie, CHU Béni-Messous, Alger, Algérie.
- 5.Laboratoire d'Immunologie, Institut Pasteur d'Algérie, Alger, Alger
- 6.Laboratoire d'Immunologie et d'Histocompatibilité AP-H, IUH and INSERM U662,Hôpital Saint-Louis, Paris, France.
- 7.Laboratoire de Biologie, Unité d'Immunologie, CHU Béni-Messous, Alger, Algérie.

## Résumé:

### Introduction:

Les cytokines jouent un rôle important dans la coordination, la persistance et l'exacerbation de la réaction allergique dans les voies respiratoires. Outre les cytokines de la voie TH2, les cytokines pro-inflammatoires (IL1, TNF $\alpha$  et IL6) et les chimiokines jouent aussi un rôle non négligeable dans ce processus inflammatoire.

**Objectif :** L'objectif de ce travail est d'étudier les polymorphismes des gènes du TNF $\alpha$  (-308 A/G), de l'IL1b (-511 C/T) et (+3954 C/T), de l'IL1Ra (VNTR au niveau de l'intron 2), de l'IL6 (-174 G/C) et enfin de la chimiokine MCP1 (-2518 G/A), chez des malades algériens allergiques à l'acarien Dermatophagoïdes pteronyssinus (allergène Der p 1) et de rechercher une éventuelle association entre ces polymorphismes et la maladie.

### Patients et méthodes:

Etude cas témoin effectuée sur 125 sujets allergiques au Der p 1 et 100 sujets sains non apparentés, appariés en âge et en sexe. Le dosage des IgE totales a été réalisé par technique ELISA simple sandwich. Le dosage des IgE spécifiques anti-Der p 1 a été réalisé par technique de chimiluminescence. L'analyse des polymorphismes des cytokines pro-inflammatoires a été faite par des techniques de biologie moléculaire: PCR RFLP (IL-1b et MCP), PCR (IL1Ra) et PCR SSP (IL-6 et TNF $\alpha$ ).

## Résultats:

Le génotype homozygote TT du polymorphisme IL-1b (-511 C/T) a été plus fréquemment retrouvé chez les sujets sains 20% VS 9.6% chez les sujets allergiques avec une différence significative ( $p=0.02$ ). De plus, ce génotype est associé à de plus faibles taux d'IgE totales par rapport aux génotypes CC et CT ( $p=0.01$ ). Cependant aucune différence significative n'a été retrouvée pour les IgE spécifiques.

De même, le génotype hétérozygote CT du polymorphisme IL-1b (+3954 C/T) a été plus fréquemment retrouvé chez les témoins 32.8% VS 50% chez les sujets allergiques avec une différence significative retrouvée chez les sujets de sexe féminin ( $p=0.009$ ). A l'inverse, le génotype TT du polymorphisme IL-1b (+3954 C/T) est plus fréquent chez les sujets allergiques 26.4 % VS 14% chez les témoins avec une différence significative ( $p=0.02$ ) retrouvée chez les sujets de sexe féminin.

L'analyse des fréquences génotypiques et alléliques des polymorphismes: IL1ra VNTR au niveau de l'intron 2, MCP1 (-2518 G/A), TNF  $\alpha$  (-308 A/G) et de l'IL6 (-174 G/C), ainsi que l'analyse du profil de sécrétion des cytokines n'ont montré aucune différence statistiquement significative entre les malades et les témoins.

Par ailleurs, la comparaison des fréquences génotypiques du polymorphisme l'IL6 (-174 G/C) selon le taux sérique des IgE totales chez les patients allergiques a révélé une association du génotype GG avec des taux plus faibles d'IgE totales ( $p=0.01$ ). Aucune différence significative n'a été retrouvée pour les IgE spécifiques.



## Conclusion:

Dans la population algérienne, le génotype IL-1b (+3954 TT) semble prédisposer à l'asthme allergique monosensibilisée à l'acarien *Dermatophagoïdes pteronyssinus*, alors que les génotypes IL-1b (-511 TT) et IL-1b (+3954 CT) seraient plutôt protecteurs. De plus, les génotypes IL6 (-174 GG), IL-1b (-511 TT) et IL-1b (+3954 CT) seraient associés à des taux plus faibles d'IgE totales.

## 1. Introduction:

L'asthme et les manifestations allergiques sont des désordres inflammatoires complexes et hétérogènes. Leur origine multifactorielle résulte de l'interaction de plusieurs régions géniques avec différents facteurs environnementaux pouvant être protecteurs ou au contraire aggravants(1).

Les cytokines jouent un rôle important dans la coordination, la persistance et l'exacerbation de la réaction allergique dans les voies respiratoires. Outre les cytokines de la voie TH2, les cytokines pro-inflammatoires (IL1, TNF $\alpha$  et IL6) et les chimiokines jouent aussi un rôle non négligeable dans ce processus inflammatoire(2).

L'implication de la composante génétique d'une part, et des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires d'autre part, dans la survenue de l'asthme allergique, ont conduit à l'étude du polymorphisme de plusieurs gènes codant pour ces cytokines ou leurs récepteurs à la recherche d'allèles de prédisposition à l'asthme ou au contraire jouant un rôle protecteur(3).

L'objectif de ce travail est d'étudier les polymorphismes du TNF $\alpha$  (A/G -308), de l'IL1b (C/T -511) et (C/T +3954), de l'IL1Ra (VNTR au niveau de l'intron 2), de l'IL6 (G/C -174) et enfin de la chimiokine MCP1 (G/A -2518), chez des malades algériens allergiques à l'acariens *Dermatophagoïdes pteronyssinus* (allergène Der p 1) et de rechercher une éventuelle association entre ces polymorphismes et la maladie.

## 2. Patients et méthodes:

### 2.1. Patients et témoins:

Une étude cas-témoins a été effectuée sur 125 sujets allergiques au Der p 1 et 100 sujets sains non apparentés. Les caractéristiques générales des deux populations étudiées sont regroupées dans le **tableau 1**.

Les critères d'inclusion des patients étaient : a) Asthme atopique (le diagnostic de l'asthme allergique a été retenu sur la base de l'association des critères suivants : symptômes cliniques de l'asthme atopique, tests cutanés positifs, taux

des IgE totales sériques >150 UI/ml et taux des IgE spécifiques sériques anti-Der p 1 > 0.35 kU/l), et b) Monosensibilisation au *Dermatophagoïdes pteronyssinus* (Der p 1).

Les patients ont été recrutés de deux centres d'allergologie à Alger : celui du centre hospitalo-universitaire de Beni Messous et celui de l'établissement privé d'allergologie de Ben Aknoun. La population malade étudiée inclut 72 femmes et 53 hommes avec un âge moyen de 21,92 11,27.

La population témoin a été recrutée, tout comme les patients allergiques, des deux centres sus-cités (partagent les mêmes facteurs environnementaux) : 68 femmes et 32 hommes avec un âge moyen de 27,05 10,51. Les critères d'inclusions des sujets témoins étaient : a) Absence de pathologies inflammatoires et respiratoires allergiques, b) Aucune histoire personnelle ou familiale d'atopie, c) Pricks tests négatifs aux pneumallergènes communs, d) Taux des IgE totales sériques <150 UI/ml et e) Taux des IgE spécifiques sériques anti-Der p 1 < 0.35 KU/l.

Le comité d'éthique local a approuvé cette étude et un consentement éclairé a été obtenu de la part de tous les sujets (sains et malades).

### 2.2. Méthodes:

#### \*Tests cutanés:

Des pricks tests ont été réalisés (Laboratoire des Stallergènes, France) : La batterie des allergènes contient : *Dermatophagoïdes pteronyssinus*, *Dermatophagoïdes farinae*, blattes, poils du chat, poils du chien, cinq pollens d'herbacées (vernale, timothée, pâturin, ivraie et dactyle) et pollen de l'olivier ainsi que la moisissure *Alternaria alternata*.

#### \*Dosage des IgE totales sériques:

Le taux des IgE totales sériques a été mesuré par technique ELISA simple sandwich (ELISA-IPA) développée à l'institut Pasteur d'Algérie (IPA).

#### \*Dosage des IgE spécifiques:

Le taux des IgE spécifiques sériques anti-Der p 1 a été déterminé par technique de chimiluminescence automatisée sur Immunlite 2000 Siemens®.

#### \*Analyse génétique:

Les prélèvements ont été réalisés à partir du sang périphérique dans des tubes EDTA. L'extraction de l'ADN génomique fut réalisée selon la technique phénol/chloroforme qui repose sur le principe de déprotéinisation par le phénol et extraction des acides nucléiques dans la phase aqueuse dans un premier temps,



puis l'élimination des traces du solvant par le chloroforme(4).

L'étude des polymorphismes du TNF $\alpha$  (A/G -308), de l'IL1b (C/T -511) et (C/T +3954), de l'IL1Ra VNTR, de l'IL6 (G/C -174) et MCP1 (G/A-2518) a été réalisée par techniques de biologie moléculaire (PCR-RFLP, PCR-SSP et PCR-VNTR)(5,6).

*Etudes des polymorphismes de l'IL-1b -511C/T, IL-1b +3954 C/T et MCP 1 -2518A/G par PCR digestion enzymatique ou PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism):*

Ces polymorphismes ont été recherchés sur l'ensemble des échantillons (patients et témoins) par PCR-RFLP. La séquence des oligonucléotides utilisés : l'IL-1b -511C/T F : 5' TGG CAT TGA TCT GGT TCA TC 3' et R : 5' GTT TAG GAA TCT TCC CACTT 3'; l'IL-1b 3953 C/T F : 5' GTT GTC ATC AGA CTT TGA CC 3' et R : 5' TTC AGT TCA TAT GGA CCA GA 3' et MCP 1 -2518A/G F : 5' -TCT CTC ACG CCA GCA CTG ACC-3' et R : 5' -GAG TGT TCA CAT AGG CTT CTG-3'. Le mélange réactionnel contient 1  $\mu$ l d'ADN (100ng/ $\mu$ l) du tampon MgCl<sub>2</sub>, dNTP (10 mM) et les Primers (25 pM/ $\mu$ l). L'amplification est réalisée sur Gene-Amp PCR system 9700 (PE Biosystems), après une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 minutes suivies de 35 cycles d'une dénaturation à 94°C pendant 30s, une hybridation à 53°C pour les SNP IL-1b et 55°C pour le MCP1 pendant 30s et une extension à 72°C pendant 30s avec une extension finale à 72°C pendant 10 minutes. On procède à la digestion enzymatique de chacun des produits PCR (10  $\mu$ l) dans un volume de 10  $\mu$ l du mélange réactionnel, l'AvaI pour l'IL-1b -511C/T, la TaqI pour l'IL-1b 3953 C/T et la PvuII pour le MCP 1 -2518A/G. La migration des produits digérés se fait sur un gel d'agarose (2%) pendant 45 minutes. Les profils électrophorétiques obtenus sont de trois types : (1) pour l'IL-1b -511C/T une bande de 305 Pb qui correspond à l'homozygote TT, une bande de 190 Pb qui correspond à l'homozygote CC et de deux bandes 305, 190 Pb pour le profil hétérozygote, (2) pour l'IL-1b -3953 C/T une bande de 250 Pb qui correspond à l'homozygote TT, une bande de 136 Pb qui correspond à l'homozygote CC et de deux bandes 250, 136 Pb pour le profil hétérozygote, (3) pour le MCP 1 -2518A/G une bande de 234 Pb qui correspond à l'homozygote TT, une bande de 159 Pb qui correspond à l'homozygote CC et de deux bandes 234, 159 Pb pour le profil hétérozygote,

*Etude du polymorphisme IL-1Ra VNTR au niveau de l'intron 2 par PCR:*

Ce polymorphisme a été recherché sur l'ensemble des échantillons (patients et témoins) par PCR. La séquence des deux oligonucléotides utilisés : IL-1Ra (86pb VNTR) F : 5' CTC AGC AAC ACT CCT AT 3' et R : 5' TCCTGGTCT GCA GGT AA 3'. Le mélange réactionnel contient 1  $\mu$ l d'ADN (100ng/ $\mu$ l) du tampon MgCl<sub>2</sub> (50mM), dNTP (10 mM) et les Primers IL-1Ra (86pb VNTR) (25 pM/ $\mu$ l). L'amplification est réalisée sur Gene-Amp PCR system 9700 (PE Biosystems), après une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 minutes suivies de 35 cycles d'une dénaturation à 94°C pendant 30s, une hybridation à 50°C pendant 30s et une extension à 72°C pendant 30s avec une extension finale à 72°C pendant 10 minutes. La migration des amplicons se fait sur gel d'agarose (2%) à 100 V pendant 30 minutes. Les profils électrophorétiques obtenus sont de cinq types : une bande de 410 Pb qui correspond à l'allèle 1 (4 séquences répétitives), une bande de 240 Pb qui correspond à l'allèle 2 (2 séquences répétitives), une bande de 325 Pb qui correspond à l'allèle 3 (3 séquences répétitives), une bande de 500 Pb qui correspond à l'allèle 4 (5 séquences répétitives), une bande de 595 Pb qui correspond à l'allèle 5 (6 séquences répétitives).

*Etudes des polymorphismes IL-6 -174G/C, TNF $\alpha$  -308 G/A par PCR-SSP:*

Le génotypage de ces cytokines, a été réalisé à partir des ADN génomiques de tous les patients et témoins par la technique PCR-SSP de ONE LAMBDA, INC (CYTOKINE GENOTYPING TRAY). Les plaques de génotypage des cytokines « CYTOKINE GENOTYPING TRAY » contiennent, dans chacun des 96 puits des amorces pré-optimisées sous forme lyophilisée servant à l'amplification des allèles des cytokines sélectionnées. Chaque plaque comprend un puits de contrôle négatif qui détecte la présence éventuelle de produits amplifiés contaminants. La révélation des amplicons s'effectue par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% dans du tampon TBE 1X. à 220V pendant 20 minutes.

### 2.3. Analyse statistique

Les données sont exprimées en moyennes et fréquences. La confirmation de la distribution normale des différentes variables a été obtenue par le test de Kolmogorov-Smirnov. La différence de fréquence des polymorphismes étudiés entre patients asthmatiques et témoins et l'équilibre de Hardy-Weinberg ont été analysés par le test  $\chi^2$  avec la correction de Yates.



inclus dans le bras court du chromosome 6 (région HLA) (10). Les clusters géniques sont représentés dans la **figure 5**. Un polymorphisme biallélique au niveau du promoteur (TNF $\alpha$ -308 G/A) serait associé à l'asthme. Cependant, le rôle exact de ce gène reste difficile à apprécier vu le fort déséquilibre de liaison des gènes HLA.

La famille des gènes de l'IL1 (IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$  et IL1Ra) est située au niveau des bandes 13 et 14 du bras long du chromosome 2, qui est précisément une région liée significativement à l'asthme(11). Les clusters géniques sont représentés dans la **figure 6**. Le gène de l'IL1 $\beta$  possède plusieurs polymorphismes et plus particulièrement ceux du promoteur C/T -511 qui serait associé à une plus grande activité du promoteur et celui de l'exon 5 C/T +3954. L'IL1Ra qui est un récepteur antagoniste de l'IL1 possède un polymorphisme penta-allélique dû à la répétition d'une séquence de 86 pb en tandem : VNTR (variable number tandem repeat) avec cinq allèles définis : IL1-Ra\*1 (quatre répétitions), IL1-Ra\*2 (deux répétitions), IL1-Ra\*3 (cinq répétitions), IL1-Ra\*4 (trois répétitions) et l'IL1-Ra\*5 (six répétitions)(12,13).

L'interleukine 6, cytokine pleiotrope de 26 kDa, est codée par le chromosome 7. Le polymorphisme le plus étudié est le variant IL6-174 G/C se situant au niveau du promoteur de ce gène.

Enfin un polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP) dans la région du promoteur du MCP-1 (A/G -2518), localisée sur le chromosome 17, a été décrit et pourrait augmenter l'expression de cette chimiokine en réponse à des stimuli inflammatoires.

#### **\*IL1 $\beta$ et IL1Ra:**

Dans notre étude, le génotype homozygote IL-1 $\beta$  511 TT a été plus fréquemment retrouvé chez la population saine contrairement à l'étude turqueréalisée sur 328 enfants asthmatiques et 246 sujets sains chez lesquelles on retrouve une prédominance du génotype CC(14).

Une association de l'allèle IL1Ra\*2 (IL1Ra intron 2) avec l'asthme a été observée dans cette même étude avec des IgE spécifiques élevées chez les malades ayant le génotype homozygote IL1Ra\*2/2. Les résultats d'une étude indienne récente(15) rejoignent ceux de l'étude turque.

En outre, dans une étude familiale réalisée en Allemagne, l'allèle IL1Ra\*2 était plus prévalent chez les malades sans toutefois atteindre le seuil de significativité (  $p = 0,06$ )(14). De même l'étude tunisienne de Dhaouadi.T et al. a retrouvé l'association du génotype homozygote avec l'asthme ainsi qu'une élévation significative des taux des

IgE chez les malades ayant l'allèle IL1Ra\*2 mais sans association haplotypique avec la maladie asthmatique(16).

Dans notre étude, aucune association n'a été retrouvée entre le polymorphisme de l'ILRa VNTR et l'asthme.

En ce qui concerne le polymorphisme de l'IL1 $\beta$  (C/T +3954), une association des génotypes homozygote TT et hétérozygote CT, avec l'asthme allergique a été retrouvée dans notre étude chez les sujets de sexe féminin. Alors que le premier, plus fréquent chez les sujets asthmatiques, serait un facteur prédisposant, le second, plus fréquent chez les sujets sains, serait plutôt un génotype protecteur.

Cependant, dans l'étude tunisienne sus-citée(16)(seule étude effectuée sur ce polymorphisme), le génotype IL1 $\beta$ +3954 TT était plus retrouvé chez les témoins et constituerait un facteur protecteur dans la population tunisienne.

#### **\*TNF $\alpha$ :**

Dans notre étude, aucune association n'a été retrouvée entre le polymorphisme du TNF $\alpha$  (A/G -308) et l'asthme allergique. Nos résultats corroborent ceux des études turque et russe réalisées sur 46 et 89 sujets asthmatiques respectivement(17,18).

Néanmoins, d'autres études faites dans d'autres populations ont retrouvé des associations statistiquement significatives entre ce polymorphisme et l'asthme. En effet, Jiffri EH et al. ainsi que Shaker OG et al. ont observé une forte association de l'allèle TNF $\alpha$ (-308)\*A avec la survenue de l'asthme dans une population égyptienne infantile(19,20). Ces résultats corroborent ceux de la méta-analyse chinoise de Li X et al. (OR = 1.36, 95% CI = 1.13-1.63 pour AA+AG vs. GG)(21). Il en est de même pour l'étude de Kumar A et al. réalisée sur 123 sujets asthmatiques indiens ( $p=0.031$ )(22) ainsi que l'étude coréenne de Hong et al. réalisée chez 788 enfants asthmatiques, révélant une association entre l'allèle TNF $\alpha$ (-308)\*A et un asthme sévère avec un abaissement du seuil de réactivité bronchique lors du test de provocation à la méthacoline(23). Fait intéressant, cette sévérité est plus prononcée en présence de deux copies de l'allèle A suggérant que l'influence de ce polymorphisme est dose-dépendante. Ces résultats rejoignent ceux de l'étude de Li Kam Wa et al., qui ont également retrouvé une association de ce SNP avec l'hyper-réactivité bronchique(24). Enfin dans l'étude iranienne de Daneshmandi S et al, le génotype TNF- $\alpha$ -308GA a été plus fréquemment retrouvé chez les sujets asthmatiques et



Les moyennes des deux groupes ont été comparées en utilisant le test t avec la correction de Welch's. Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel SPSS 10.0. Le seuil de significativité a été fixé à 0,05 correspondant à un intervalle de confiance (IC) supérieur ou égale à 95 %.

### 3. Résultats :

\*Polymorphisme du TNF $\alpha$  (A/G -308) et de l'IL6 (G/C -174):

Aucune différence statistiquement significative n'a été retrouvée en comparant les fréquences alléliques et génotypiques, des malades et des témoins, concernant le polymorphisme du TNF  $\alpha$  (A/G -308) et de l'IL6 (G/C -174) ainsi que les profils de sécrétion de ces deux cytokines en fonction de ces polymorphismes (**Tableau 2**).

En revanche, une différence significative a été retrouvée en comparant les concentrations des IgE totales des sujets porteurs du génotype IL6 (-174) GC et CC avec ceux porteurs du génotype GG ( $p=0.01$ ) (**Figure 1**). Aucune différence n'a été retrouvée pour les IgE spécifiques.

\*Polymorphisme de l'IL1b (C/T -511) et (C/T +3954) et de l'IL1Ra VNTR:

Les fréquences alléliques et génotypiques de ces polymorphismes chez les malades et les témoins sont regroupés dans le **tableau 3**.

Le génotype homozygote IL-1b(-511 TT) a été plus fréquemment retrouvé chez les sujets sains : 20 (20%) VS 12 (9.6%) chez les sujets allergiques avec une différence significative ( $p=0.02$ ).

Une différence significative a été retrouvée en comparant les concentrations des IgE totales chez les sujets porteurs du génotype CC et CT avec les porteurs du génotype TT ( $p=0.01$ ) (**Figure 2**) mais aucune n'a été retrouvée pour les IgE spécifiques.

De même, le génotype hétérozygote IL-1b (+3953CT) a été plus fréquemment retrouvé chez les témoins : 41 (32.8%) VS 50 (50%) chez les sujets allergiques avec une différence significative retrouvée chez les sujets de sexe féminin ( $p=0.009$ ) (**figure 3**). A l'inverse, le génotype IL-1b (+3953 TT) est plus fréquent chez les sujets allergiques : 33 (26.4 %) VS 14 (14%) chez les témoins avec une différence significative ( $p=0.02$ ) retrouvée chez les sujets de sexe féminin (**figure 3**).

Par contre aucune différence significative n'a été observée pour les génotypes IL-1b -511 CC et CT, et IL-1b +3953 CC entre les groupes témoins et malades. Il en est de même pour le polymorphisme de l'IL1Ra VNTR au niveau de l'intron 2.

\*Polymorphisme du MCP1 -2518G/A:

Tout comme le TNF $\alpha$  et l'IL6, nous n'avons pas retrouvé de différences statistiquement significatives entre les sujets allergiques et les témoins en ce qui concerne le polymorphisme de MCP1 -2518G/A (**Tableau 2**).

### 4. Discussion:

La réaction inflammatoire au cours de l'asthme inclut une phase d'initiation ou de sensibilisation à l'allergène, une phase effectrice, après contact ultérieur avec l'allergène, avec la libération de multiples médiateurs par les mastocytes, polynucléaires neutrophiles (PNN), éosinophiles (PNE), macrophages et lymphocytes, et enfin, une phase de remodelage des voies aériennes. À côté des médiateurs classiques : histamine et leucotriènes, on insiste actuellement sur le rôle essentiel des cytokines pro-inflammatoires (IL1, TNF $\alpha$  et IL6) et des chimiokines, qui sont des acteurs essentiels du trafic cellulaire local(7).

Les effets de l'IL1 $\beta$  et du TNF $\alpha$  sont assez proches (**figure 4**) : ils induisent l'expression d'autres cytokines comme : IL3, IL4, IL5, RANTES, IL-8 and GM-CSF par les cellules épithéliales respiratoires, augmentent l'expression des molécules d'adhésion comme ICAM-1 et VCAM-1 par les cellules endothéliales optimisant ainsi l'afflux des neutrophiles et éosinophiles au niveau des voies respiratoires. Ils induisent aussi la prolifération des fibroblastes et sont donc impliqués dans le processus de fibrose(2).

La contribution de l'ILRa dans l'asthme a été mise en évidence dans une étude réalisée chez 30 rats de souris avec un profil asthmatique chez lesquelles l'injection de l'IL1Ra a constitué un traitement très efficace, et ce, en inhibant la transcription de STAT6 et NF-kB en ARNm(8).

L'IL6 joue le rôle d'un facteur de croissance hématopoïétique, de différenciation terminale des LB en plasmocytes sécrétant d'immunoglobulines ainsi que le rôle de cofacteur de l'IL4 dans la synthèse des IgE(2).

De même les chimiokines jouent un rôle dans l'hyperréactivité bronchique notamment la chimiokine de la famille CC : Monocyte chemoattractant protein -1 (MCP-1) ou CCL2. Cette dernière semble intervenir dans la phase précoce de la réponse allergique de part sa capacité à activer les mastocytes et à libérer le LTC4 dans les voies respiratoires, responsable de l'hyperréactivité bronchique(9). Les effets engendrés par ces cytokines reflètent l'intérêt des différentes études des polymorphismes des gènes de ces derniers au cours de l'asthme.

Le gène codant pour le Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) est



constituerait un facteur de risque(25). Ces résultats rejoignent ceux de l'étude italienne réalisée chez 57 sujets

#### References:

1. LeSouëf P. Genetics of asthma: what do we need to know? *Pediatr Pulmonol Suppl.* sept 1997;15:3-8.
2. Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax.* sept 1999;54(9):825-857.
3. Dessaint J-P. Génétique de l'asthme et des allergies. *Rev Fr Allergol Immunol Clin.* avr 2005;45(3):200-207.
4. Sambrook J, Russell DW. Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. *CSH Protoc.* 2006;2006(1).
5. Meenagh A, Williams F, Ross OA, Patterson C, Gorodezky C, Hammond M, et al. Frequency of cytokine polymorphisms in populations from western Europe, Africa, Asia, the Middle East and South America. *Hum Immunol.* nov 2002;63(11):1055-1061.
6. Parks CG, Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW, Gilkeson GS, et al. Systemic lupus erythematosus and genetic variation in the interleukin 1 gene cluster: a population based study in the southeastern United States. *Ann Rheum Dis.* janv 2004;63(1):91-94.
7. Tillie-Leblond I, Iliescu C, Deschildre A. [Physiopathology of inflammatory events in asthma]. *Arch Pédiatrie Organe Off Société Fr Pédiatrie.* juin 2004;11 Suppl 2:58s-64s.
8. Liu Z-C, Wang Y-Y, Zou M-J, Wang J-X, Xu D-G. [Effects of interleukin 1 receptor antagonist on allergy asthma in rat model and its mechanism]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 9 sept 2008;88(34):2432-2436.
9. Campbell EM, Charo IF, Kunkel SL, Strieter RM, Boring L, Gosling J, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 mediates cockroach allergen-induced bronchial hyperreactivity in normal but not CCR2<sup>-/-</sup> mice: the role of mast cells. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15 août 1999;163(4):2160-2167.
10. Bouzigon E, Dizier M-H, Krähenbühl C, Lemainque A, Annesi-Maesano I, Betard C, et al. Clustering patterns of LOD scores for asthma-related phenotypes revealed by a genome-wide screen in 295 French EGEA families. *Hum Mol Genet.* 15 déc 2004;13(24):3103-3113.
11. Ober C. Perspectives on the past decade of asthma genetics. *J Allergy Clin Immunol.* août 2005;116(2):274-278.
12. Dale M, Nicklin MJ. Interleukin-1 receptor cluster: gene organization of IL1R2, IL1R1, IL1RL2 (IL-1Rrp2), IL1RL1 (T1/ST2), and IL18R1 (IL-1Rrp) on human chromosome 2q. *Genomics.* 1 avr 1999;57(1):177-179.



13. Mao XQ, Kawai M, Yamashita T, Enomoto T, Dake Y, Sasaki S, et al. Imbalance production between interleukin-1beta (IL-1beta) and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) in bronchial asthma. *Biochem Biophys Res Commun.* 24 sept 2000;276(2):607-612.
14. Zeyrek D, Demir E, Alpman A, Ozkinay F, Gulen F, Tanac R. Association of interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms in Turkish children with atopic asthma. *Allergy Asthma Proc Off J Reg State Allergy Soc.* oct 2008;29(5):468-474.
15. Birbian N, Singh J, Jindal SK. High risk association of IL-1 receptor antagonist (IL-1RN) VNTR polymorphism with asthma in a North Indian population: a pilot study. *Cytokine.* juin 2013;62(3):389-394.
16. Dhaouadi T, Sfar I, Aouadi H, Amri M, Jendoubi-Ayed S, Bouacha H, et al. Polymorphismes des cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$  et IL1) au cours de l'asthme allergique. *Rev Fr Allergol.* déc 2011;51(8):659-663.
17. Aytekin C, Doğu F, İkinciöğullari A, Eğin Y, Yüksek M, Bozdoğan G, et al. [TGF-Beta1-915G/C and TNF-alpha-308G/A polymorphisms in children with asthma]. *Tüberküloz Ve Toraks.* 2009;57(1):62-67.
18. Cherkashina II, Nikulina SI, Logvinenko NI, Voevoda MI, Maksimov VN, Liberдовskaia ED. [The specific features of TNF-alpha gene polymorphism in asthmatic patients and their relatives]. *Probl Tuberk Bolezn Legk.* 2009;(8):51-56.
19. Jiffri EH, Elhawary NA. The impact of common tumor necrosis factor haplotypes on the development of asthma in children: an Egyptian model. *Genet Test Mol Biomark.* mai 2011;15(5):293-299.
20. Shaker OG, Sadik NAH, El-Hamid NA. Impact of single nucleotide polymorphism in tumor necrosis factor- $\alpha$  gene 308G/A in Egyptian asthmatic children and wheezing infants. *Hum Immunol.* juin 2013;74(6):796-802.
21. Li X, Zhang Y, Zhang J, Xiao Y, Huang J, Tian C, et al. Asthma susceptible genes in Chinese population: a meta-analysis. *Respir Res.* 2010;11:129.
22. Kumar A, Gupta V, Changotra H, Sarin BC, Sehajpal PK. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and transforming growth factor- $\beta$ 1 polymorphisms in bronchial asthma. *Indian J Med Sci.* août 2008;62(8):323-330.
23. Hong S-J, Kim H-B, Kang M-J, Lee S-Y, Kim J-H, Kim B-S, et al. TNF-alpha (-308 G/A) and CD14 (-159T/C) polymorphisms in the bronchial responsiveness of Korean children with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* févr 2007;119(2):398-404.
24. Li Kam Wa TC, Mansur AH, Britton J, Williams G, Pavord I, Richards K, et al. Association between -308 tumor necrosis factor promoter polymorphism and bronchial hyperreactivity in asthma. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* sept 1999;29(9):1204-1208.
25. Daneshmandi S, Pourfathollah AA, Pourpak Z, Heidarnazhad H, Kalvanagh PA. Cytokine gene polymorphism and asthma susceptibility, progress and control level. *Mol Biol Rep.* févr 2012;39(2):1845-1853.
26. Ricciardolo FLM, Sorbello V, Silvestri M, Giacomelli M, Debenedetti VMG, Malerba M, et al. TNF-alpha, IL-4R-alpha and IL-4 polymorphisms in mild to severe asthma from Italian Caucasians. *Int J Immunopathol Pharmacol.* mars 2013;26(1):75-84.
27. Kosugi EM, de Camargo-Kosugi CM, Hirai ER, Mendes-Neto JA, Gregorio LC, Guerreiro-da-Silva IDC, et al. Interleukin-6 -174 G/C promoter gene polymorphism in nasal polyposis and asthma. *Rhinology.* mars 2013;51(1):70-76.
28. Settin A, Zedan M, Farag M, Ezz El Regal M, Osman E. Gene polymorphisms of IL-6(-174) G/C and IL-1Ra VNTR in asthmatic children. *Indian J Pediatr.* oct 2008;75(10):1019-1023.
29. Dhaouadi T, Sfar I, Aounallah-Skhiri H, Jendoubi-Ayed S, Bouacha H, Ben Abdallah T, et al. MCP-1, CCR2 and CCR5 polymorphisms in Tunisian patients with atopic asthma. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* mars 2013;12(1):29-36
30. Holla LI, Mrazek F, Petrek M. MCP-1 and CCR2 gene polymorphisms in Czech patients with allergic disorders. *Int J Immunogenet.* févr 2009;36(1):69-72.

## Tableaux et figures :

**Tableau 1 :**  
Caractéristiques générales de la population étudiée

| Caractéristiques                          | Témoins<br>(N = 100) | Patients<br>(N = 125) |
|-------------------------------------------|----------------------|-----------------------|
| Age (moyenne $\pm$ SD)                    | 27,05 10,51          | 21,92 11,27           |
| Sujet de sexe masculin                    | 32 (32%)             | 53 (42,4%)            |
| Sexe féminin                              | 68 (68%)             | 72 (57,6%)            |
| Symptômes d'allergie (%)<br>respiratoires | 0                    | 100                   |
| Tests cutanés                             | Négatifs             | Positifs à Dpter      |
| IgE totales (UI/ml)                       | 54,4 $\pm$ 24,29     | 420,32 $\pm$ 273,23   |
| IgE spécifiques à Dpter<br>(KU/l)         | <0,35                | 59,70 $\pm$ 40,37     |



**Tableau 2 :Fréquences génotypiques et alléliques des polymorphismes IL-6 -174G/C, TNF  $\alpha$  (G-308A) et MCP1 - 2518G/A chez les sujets allergiques et les sujets témoins**

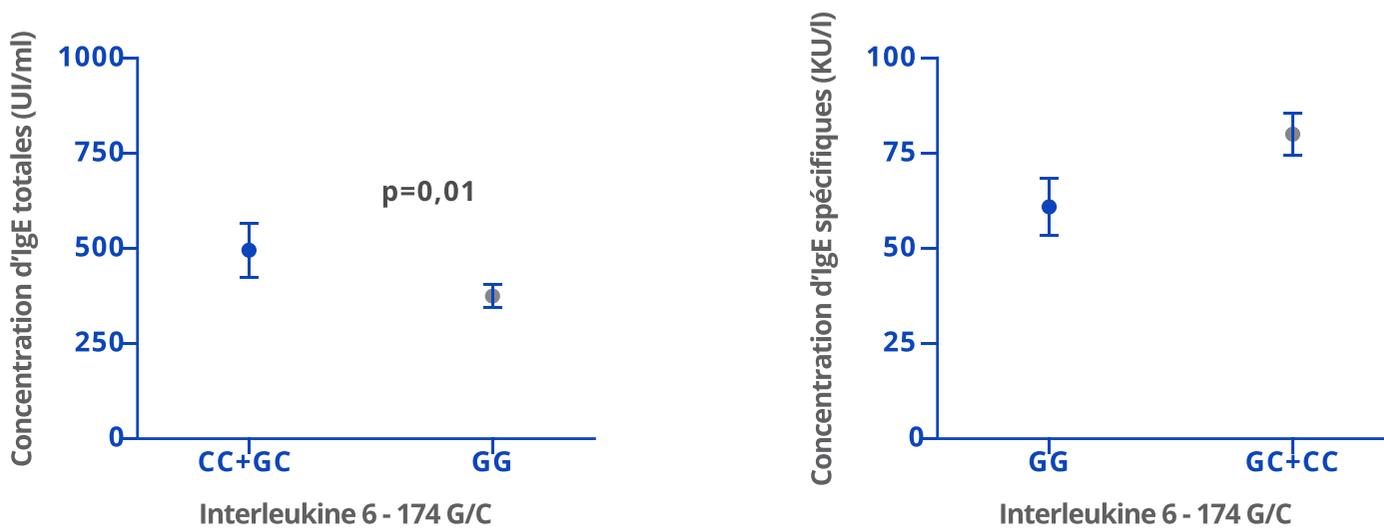
| <b>IL-6 -174G/C</b>                     | <b>Patients<br/>(N=125)</b> | <b>Témoins<br/>(N= 100)</b> | <b>P</b> | <b>Pc (Yates)</b> |
|-----------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------|-------------------|
| G                                       | 212 (84,8%)                 | 173 (86,5%)                 | NS       | NS                |
| C                                       | 38 (15,2%)                  | 27 (13,5%)                  | /        | /                 |
| GG                                      | 89 (71,2%)                  | 74 (74%)                    | /        | /                 |
| GC                                      | 34 (27,2%)                  | 25 (25%)                    | /        | /                 |
| CC                                      | 2 (1,6%)                    | 1 (1%)                      | /        | /                 |
| Profil de sécrétion                     |                             |                             |          |                   |
| Elevée                                  | 123(98,4%)                  | 73 (99%)                    | NS       | NS                |
| Bas                                     | 2 (1,6%)                    | 1 (1%)                      | /        | /                 |
| <b>TNF <math>\alpha</math> (G-308A)</b> |                             |                             |          |                   |
| G                                       | 207(82,8%)                  | 174 (87%)                   | NS       | NS                |
| A                                       | 43 (17,2%)                  | 26 (13%)                    | /        | /                 |
| GG                                      | 86 (68,8%)                  | 75(75%)                     | /        | /                 |
| GA                                      | 35 (28,0%)                  | 24 (24%)                    | /        | /                 |
| AA                                      | 4 (3,2%)                    | 1 (1%)                      | /        | /                 |
| Profil de sécrétion                     |                             |                             |          |                   |
| Elevée                                  | 39 (31,2%)                  | 26 (26%)                    | /        | /                 |
| Bas                                     | 86 (68,8%)                  | 74 (74%)                    | /        | /                 |
| <b>MCP1 - 2518G/A</b>                   |                             |                             |          |                   |
| G                                       | 60 (24%)                    | 51 (25,5%)                  | /        | /                 |
| A                                       | 190 (76%)                   | 149 (74,5%)                 | /        | /                 |
| GG                                      | 06 (4,8%)                   | 5 (5%)                      | /        | /                 |
| GA                                      | 48 (38,4%)                  | 41 (41%)                    | /        | /                 |
| AA                                      | 71 (56,8%)                  | 54 (54%)                    | /        | /                 |

**Tableau 3 :Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme -511C/T, 3953C/T du gène de l'IL-1 et IL-1RA VNTR chez les sujets allergiques et les sujets témoins.**

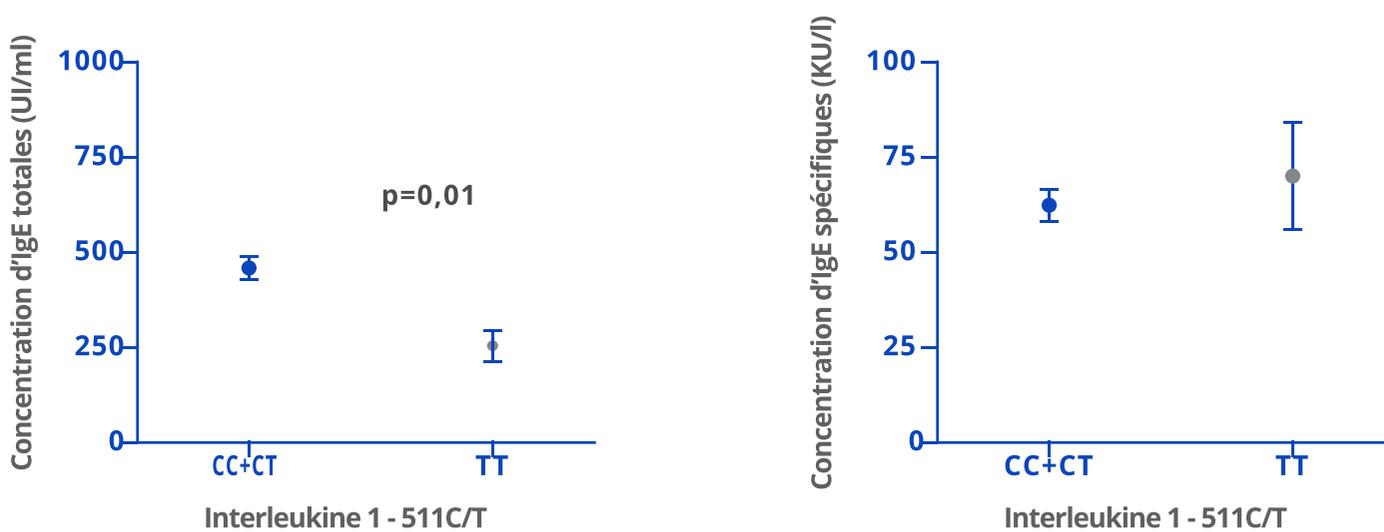
| IL-1b511C/T           | Patients (N=125) | Témoins (N= 100) | P     | Pc (Yates) | OR (95 %)            |
|-----------------------|------------------|------------------|-------|------------|----------------------|
| C                     | 162 (64,8%)      | 118 (59%)        | NS    | NS         | NS                   |
| T                     | 88 (35,2%)       | 82 (41%)         | /     | /          | /                    |
| CC                    | 49 (39, 2%)      | 38 (38%)         | /     | /          | /                    |
| CT                    | 64 (51, 2%)      | 42 (42%)         | /     | /          | /                    |
| TT                    | 12 (9,6%)        | 20 (20%)         | 0,02  | 0,04       | 0,42 CI: [0,17-0,97] |
| <b>IL-1b+ 3953C/T</b> |                  |                  |       |            |                      |
| C                     | 143 (57,2%)      | 122 (61%)        | NS    | NS         | NS                   |
| T                     | 107 (42,8%)      | 78(39%)          | /     | /          | /                    |
| CC                    | 51 (40,8%)       | 36 (36%)         | /     | /          | /                    |
| CT                    | 41 (32,8%)       | 50 (50%)         | 0,009 | 0,01       | 0,49 CI: [0,27-0,86] |
| TT                    | 33 (26,4%)       | 14 (14%)         | 0,02  | 0,03       | 2,20 CI: [1,05-4,76] |
| <b>IL-1RA VNTR</b>    |                  |                  |       |            |                      |
| 1                     | 205 (82%)        | 166 (83%)        | NS    | NS         | /                    |
| 2                     | 32 (12,8%)       | 24 (12%)         | /     | /          | /                    |
| 3                     | 5 (2%)           | 6(3%)            | /     | /          | /                    |
| 4                     | 8(3,2%)          | 4 (2%)           | /     | /          | /                    |
| 1,1                   | 85 (68%)         | 72 (72%)         | /     | /          | /                    |
| 1,2                   | 24 (19,2%)       | 16 (16%)         | /     | /          | /                    |
| 2,2                   | 3 (2,4%)         | 1(1%)            | /     | /          | /                    |
| 1,3                   | 4 (3,2%)         | 3 (3%)           | /     | /          | /                    |
| 1,4                   | 7 (5,6%)         | 4 (4%)           | /     | /          | /                    |
| 2,3                   | 1 (0,8%)         | 4 (4%)           | /     | /          | /                    |
| 2,4                   | 1 (0,8%)         | 0 (0%)           | /     | /          | /                    |
| 3,3                   | 0 (0%)           | 0 (0%)           | /     | /          | /                    |



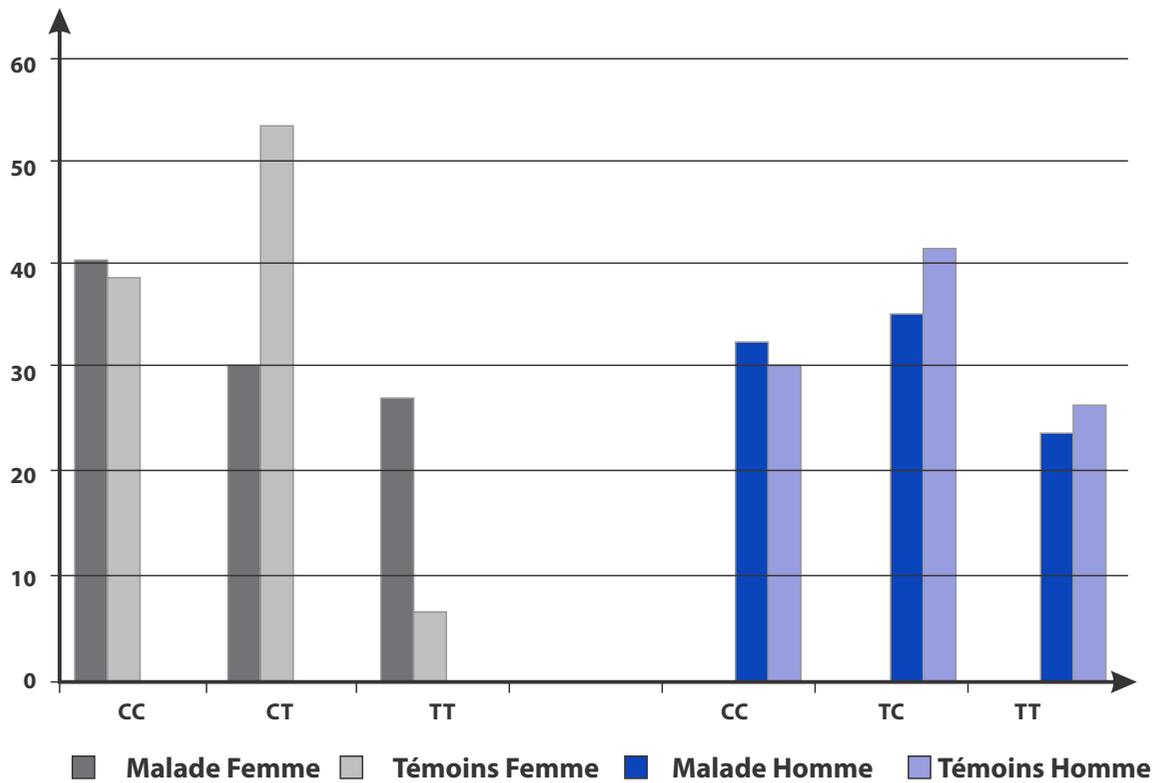
**Figure 1 :** Analyse du génotype de l'IL-6 chez le groupe de patients allergiques stratifiés selon la moyenne de la concentration sérique des IgE totales et spécifiques anti-Derp1.



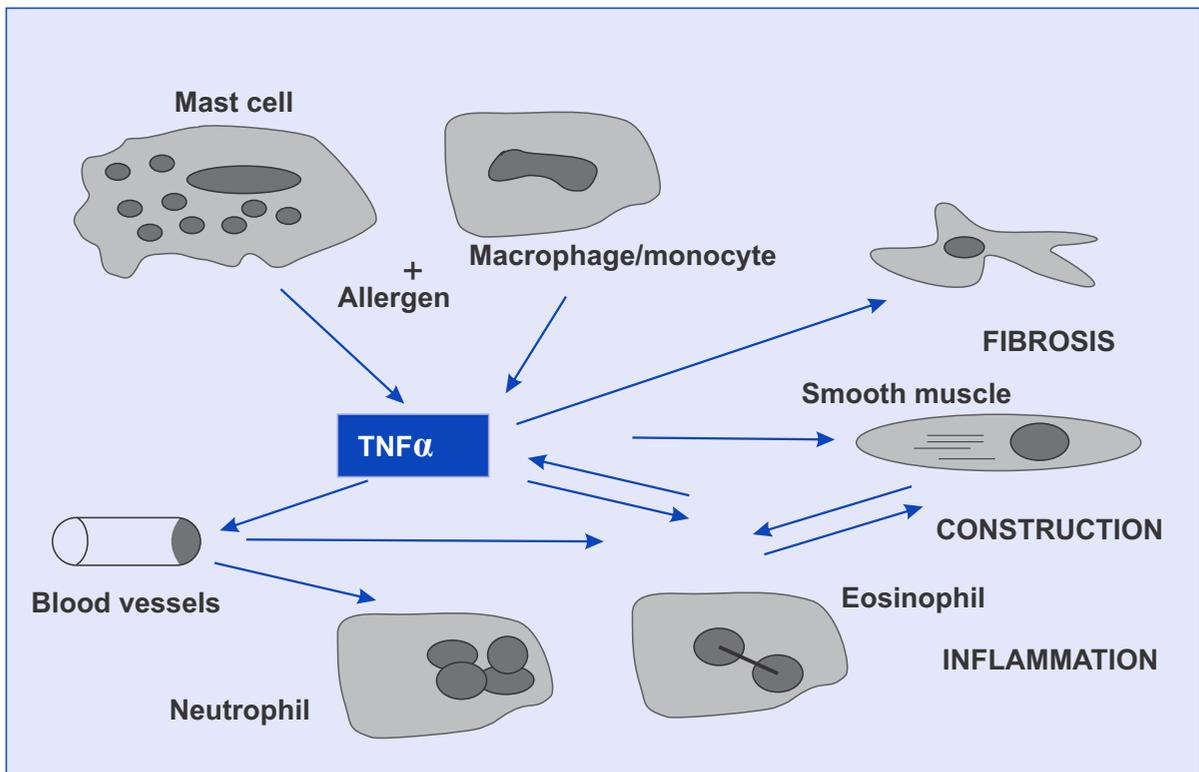
**Figure 2 :** Analyse du génotype de l'IL-1 chez les patients allergiques stratifié selon la moyenne de la concentration sérique des IgE totales et spécifiques anti-Derp1



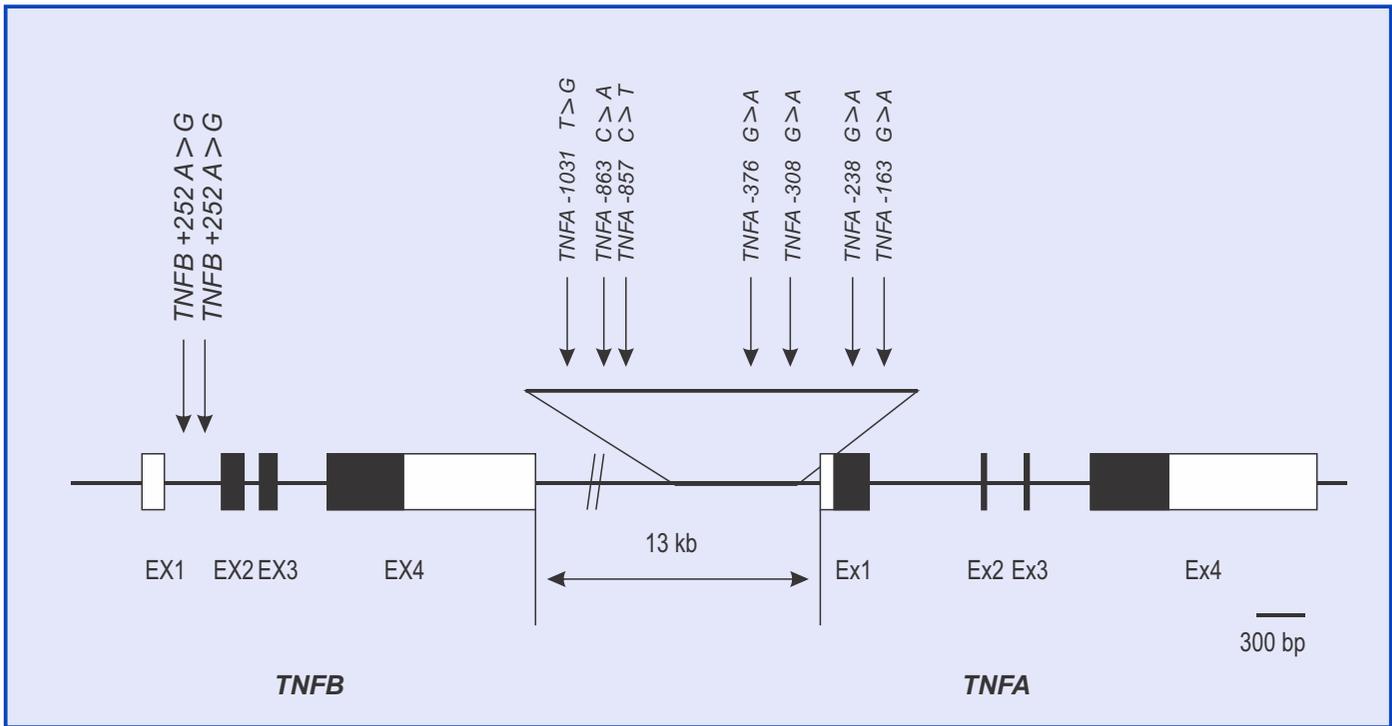
**Figure 3 :** Fréquences génotypiques du polymorphisme du gène IL-1 3953 C/T stratifié selon le sexe chez les sujets allergiques et les sujets témoins.



**Figure 4 :** Effets du TNF $\alpha$  au cours de la réaction allergique



**Figure 5 :** Cluster génique TNF sur le chromosome 6



**Figure 6 :** Cluster génique de l'IL-1 au niveau du chromosome 2

