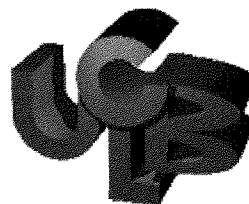


**enssib**

Ecole Nationale Supérieure
des Sciences de l'Information
et des Bibliothèques



Université Claude Bernard Lyon 1
43, boulevard du 11 Novembre 1918
69622 VILLEURBANNE CEDEX

DESS Ingénierie Documentaire
Rapport de recherche bibliographique

Les Cytokines
Expression de gène
Par dosage des ARN messagers

Sylvie Piva

Sous la direction de
Mr Bruno Mougin

BioMérieux

Année 1999-2000





Remerciements

Je remercie Monsieur Bruno Mougin et Monsieur Claude Courte de la société bioMérieux pour m'avoir confié ce vaste sujet qui m'a permis d'effectuer des recherches très variées. Je suis très heureuse d'avoir pu m'initier au domaine de la biologie moléculaire, discipline transversale et passionnante. Ce sujet m'a permis également de mieux comprendre les tests génétiques si souvent décriés et de voir en eux de grands espoirs pour la médecine de demain.

Résumé

Les cytokines sont produites par de nombreuses cellules et participent au système immunitaire. Pour les maladies autoimmunes ou inflammatoires, il existe souvent un déséquilibre entre les nombreuses cytokines. L'étude du polymorphisme des gènes impliqués ou l'étude de l'expression de gène par dosage des ARN messagers pourraient constituer un outil précieux pour le diagnostic précoce de ces maladies et permettre une meilleure prise en charge thérapeutique de la maladie.

Mots-clés : cytokines, interleukine 4, interféron gamma, expression de gène, polymorphisme, humain.

Cytokines secreted by numerous cells are involved in immunity system. During inflammatory or autoimmune diseases, a lack of balance between various cytokines might occur. The study of polymorphism of genes or the study of gene expression by mRNA quantitation could represent a powerful method for the early diagnostic of these diseases and would allow a better therapeutic treatment.

Mots-clés : cytokines, interleukin 4, interferon gamma, gene expression, polymorphism, human.

Sommaire

I – Introduction	1
II – Recherche Documentaire.....	2
II. 1 – Recherche de publications scientifiques	2
1.1 - Recherches préliminaires	2
1.1.1 - Recherche de mots-clés	2
1.1.2 - Interrogations	3
1.1.3 - Commentaires sur la pertinence	4
1.2 - Recherche sur bases de données	4
1.2.1 - Premières recherches sur CD-ROMS et choix des bases	4
1.2.2 - PubMed : accès gratuit à Medline par internet	5
1.2.3 - Embase	7
II. 2 – Recherche de brevets	9
2.1 - Recherches préliminaires – difficultés	9
2.2 - Détermination de la classe	9
2.3 - Comparatif des BDD gratuites sur internet	9
2.4 - Optimisation sur la BDD UPSO	11
II. 3 – Recherche de produits	11
3.1 - Où trouver ?	11
3.2 - Recherches sur internet et banques de données	12
3.2.1 - Recherches sur internet	12
3.2.1 - Recherches sur bdd	12
II. 3 – Bilan	13
III – Synthèse Bibliographique	14
III. 1 – Introduction	14
1.1 - Les maladies auto-immunes : problème de diagnostic	14
1.2 - Les cytokines	14
1.3 - La polyarthrite rhumatoïde	15
1.4 - L'expression de gène	15
1.5 - Quantification de l'expression de gène	16
1.5.1 - Dosage de la protéine	16
1.5.2 - Dosage de l'ARN messenger	16
III.2 – Expression de gène IL-4 et INF-gamma	16
2.1 - Mesure de l'ARN messenger de l'interleukine 4 dans la PR	16
2.2 - Mesure de l'ARN messenger de l'interferon-gamma dans la PR	17
2.3 - Polymorphisme	17
2.4 - Conclusion	17
III. 4 – Quelques produits commerciaux	17
4.1 - PCR	18
4.2 - Hybridation	18
4.3 - Les arrays	18
ANNEXE 1	19
ANNEXE 2	20
ANNEXE 3	21
Bibliographie.....	22
Sites commerciaux.....	23

I – Introduction

Les cytokines interviennent dans la régulation hormonale du système immunitaire. Le but du sujet est de dégager un état de l'art sur l'expression de gène des cytokines.

Deux points seront plus spécialement étudiés:

- Evaluation de l'expression de gène par dosage des ARN messagers.
- Etude des polymorphismes.

Mots-clés : IL4, IL12, IL2, IL1, IL6, IL10, Interféron gamma, expression de gènes, ARNm, polymorphisme (gene expression, mRNA, polymorphism).

Les recherches seront orientées vers les brevets, les publications scientifiques, les produits commerciaux et les sociétés.

Pour ce rapport, seuls l'interféron gamma et l'interleukine-4 serviront pour expliquer la stratégie de recherche. D'autre part la synthèse bibliographique sera uniquement dédiée à une maladie : **la polyarthrite rhumatoïde**.

II – Recherche Documentaire

II. 1 – Recherche de publications scientifiques

Les premières recherches ont été effectuées sur la base de données Uncover (<http://uncweb.carl.org/>) via internet de manière à cerner les mots-clés pertinents.

1.1 - Recherches préliminaires

1.1.1 - Recherche de mots-clés

En utilisant uncover, et en posant une question en langage naturel de type IL-4, on peut se rendre compte à la lecture des résumés relatifs aux articles trouvés, de la diversité rencontrée en langage naturel pour nommer les protéines choisies.

Ex : interleukin 4, interleukin-4, IL 4 ou IL-4.
interferon gamma, INF-gamma, INF gamma, INF- γ .

Uncover permet la recherche par mots-clés.

*interleukin-4 (1530 rep.) ou IL-4 (1430 rep.)

Remarque : l'absence de tiret donne le même nombre de réponses (interleukin-4 : 1530 rep. "interleukin 4" 1530 rep.) .

Tableau 1

Mots-clés Uncover	
IL4	interleukin-4 or il-4 (2783 réponses)
Interferon gamma	interferon-gamma or inf-gamma (3555 rép.)
mRNA	mrna ou messenger
polymorphism	polymorphism
gene expression	gene expression
human	human

1.1.2 - Interrogations

✓ étude du polymorphisme

En combinant le mot-clé de la protéine et le mot polymorphism, les réponses obtenues sont toutes pertinentes. Par contre la spécification de "humain" n'apporte aucune réponse. De même qu'une recherche combinée avec le mot autoimmune.

Tableau 2

Equations	Nombre de réponse:	Appréciation de la pertinence
(interleukin-4 or il-4) and polymorphism*	8	✓ ✓ ✓ ✓ très pertinent
(interleukin-4 or il-4) and polymorphism* and human	0	
(interferon-gamma or inf-gamma) and polymorphism*	9	✓ ✓ ✓ ✓ très pertinent

✓ étude de l'expression de gène

Tableau 3

Entrée	Equations	Nombre de réponses	Pertinence
1	(interleukin-4 or il-4) and (mrna or messenger)	88	+
2	(interleukin-4 or il-4) and (mrna or messenger) and human	24	++(2>1 grâce à humain)
3	(interleukin-4 or il-4) and ("")	78	-
4	(interleukin-4 or il-4) and ("") and human	26	+
5	(interleukin-4 or il-4) and (mrna or messenger) and human	1	-
6	(interferon-gamma or inf-gamma) and (mrna or messenger) and human	16	++
7	(interferon-gamma or inf-gamma) and and human	55	+
8	(interferon-gamma or inf-gamma) and and (mrna or messenger) and human	0	-

1.1.3 - Commentaires sur la pertinence

Pour la recherche sur le polymorphisme, la recherche combinée polymorphisme et protéine donne des résultats très pertinents.

Pour la recherche sur l'expression de gène et plus particulièrement le dosage des ARN messagers, la seule combinaison protéine et expression de gène apparaît trop générique. Les meilleurs résultats sont obtenus avec la combinaison ARNm et protéine et humain. Ce dernier terme permet d'éliminer un grand nombre de références dans ce cas. Toutefois si les références trouvées se rapportent bien au dosage des ARN messagers, elles ne concernent pas forcément celui recherché. La protéine étudiée dans ce cas n'étant qu'un agent exogène utilisé pour étudier l'expression d'autres gènes.

1.1.4 - Commentaires sur la base uncover

Cette base semble très pratique pour obtenir quelques références sur un sujet. Elle couvre de nombreux domaines et des revues très variées. Toutefois, le résumé offert est très bref et la combinaison de mots-clés est vite limitée. Par exemple dans le domaine biomédical, il est donc difficile de spécifier une pathologie précise ou une classe de pathologies. Elle ne peut suffire à l'élaboration d'une bibliographie.

1.2 - Recherche sur bases de données

1.2.1 - Premières recherches sur CD-ROMS et choix des bases

Les recherches sur CD-ROMS nous ont permis de faire des essais à moindre coût et également de sélectionner les bases les plus intéressantes. Quatre bases ont été testées: Medline, Biosis, Pascal et Embase.

Avec des équations du même type que celles employées pour uncover, deux bases semblent amener les meilleurs résultats : Embase et Medline qui se complètent assez bien.

Biosis a été abandonnée pour deux raisons : ses résultats sont moins nombreux que ceux obtenus par Embase et Medline; d'autre part ils sont retrouvés dans ceux obtenus par Embase. De plus cette base n'offre pas de thésaurus qui permet d'améliorer la pertinence des réponses. Pascal est abandonnée pour des raisons similaires.

1.2.2 - PubMed : accès gratuit à Medline par internet

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>)

PubMed est l'un des accès gratuits à Medline par Internet. J'ai donc privilégié PubMed plutôt que Medline sur le serveur dialog (interrogations payantes). Le prix n'est pas mon seul critère : PubMed offre une interface plus conviviale et permet d'utiliser le Mesh pour élaborer les interrogations ce qui constitue son atout majeur.

✓ utilisation du MESH

L'interrogation peut être directement élaborée à partir du MESH (Mesh Browser). Pour un terme recherché, le MESH suggère une liste de termes proches issus de l'index, si celui demandé n'est pas connu. Après sélection du terme et en effectuant "browse this term", il donne le descripteur associé encore appelé "Mesh term". (voir ANNEXE 1).

Les possibilités du MESH ne s'arrêtent pas là, il donne une définition du terme et indique la ou les positions dans l'arbre du MESH. Cet arbre étant construit en langage hypertexte, il est possible de visualiser chacune des rubriques (voir ANNEXE 2).

Plus encore...par le bouton "Detailed display", il donne la date d'entrée dans le **MESH** et les grands sujets relatifs à ce terme. A cette étape, il est possible de préparer l'interrogation en sélectionnant tout ou partie de ces sujets. Par défaut, il les retient tous (bouton "Add" this term). Il est à noter que lors de cette même étape, il est possible de ne pas éclater le terme générique, sinon PubMed le fera par défaut (voir ANNEXE 3).

On peut de cette manière élaborer sa requête en combinant au fur et à mesure les descripteurs voulus avec les opérateurs booléens (AND, OR, NOT). Une interrogation pourra être facilement élaborée en une seule fois dans un **langage parfaitement contrôlé**.

Tableau 4

Mots-clés Mesh (Medline)	
IL4	interleukin-4
Interferon gamma	Interferon type II
mRNA	RNA, Messenger
polymorphism	Polymorphism (Genetics)
gene expression	Gene expression
Autoimmune Diseases	Autoimmune Diseases

- ✓ expression de gène : dosage des ARN messagers

Toutes les recherches ont été limitées à l'être humain. La majeure difficulté lors de cette recherche est d'obtenir des résultats où la protéine recherchée n'est pas utilisée comme agent exogène. Pour y remédier nous avons longuement étudié les sous-catégories (ex.: blood, analysis, genetics,...), afin d'éliminer celles qui pouvaient amener du bruit. L'intitulé de ces catégories n'est pas disponible sur PubMed, une version plus complète du Mesh est disponible sur le site du National Institute of Health (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/2K/99MBrowser.html>). La catégorie "pharmacology" a finalement été démontrée comme fautive!

Tableau 5

Entrée	Equations	Nombre de réponses
1	interleukin-4[MESH] Limits: Human	4182
2	interleukin-4/pharmacology[MESH] Limits: Human	1803
3	"RNA, Messenger"[MESH] Limits: Human	51268
4	[MESH] Limits: Human	51518
5	"autoimmune diseases"[MESH] Limits: Human	179451
6	interleukin-4[MESH] NOT interleukin-4/pharmacology[MESH] AND "RNA, Messenger"[MESH] AND [MESH] Limits: Human	140
7	interleukin-4[MESH] NOT interleukin-4/pharmacology[MESH] AND "RNA, Messenger"[MESH] AND [MESH] AND "autoimmune diseases"[MESH] Limits: Human	15

Tableau 6

Entrée	Equations	Nombre de réponses
1	Interferon type II[MESH] NOT Interferon type II /pharmacology[MESH] AND "RNA, Messenger"[MESH] AND [MESH] Limits: Human	270
2	Interferon type II [MESH] NOT Interferon type II /pharmacology[MESH] AND "RNA, Messenger"[MESH] AND [MESH] AND "autoimmune diseases"[MESH] Limits: Human	33

- ✓ étude du polymorphisme

Tableau 7

Equations	Nbre de réponses	Appréciation de la pertinence
interleukin-4[MESH] AND Polymorphism (Genetics) Limits: Human	29	✓ ✓ ✓ ✓ ✓ très pertinent
interleukin-4[MESH] AND Polymorphism (Genetics) AND "autoimmune diseases"[MESH] Limits: Human	7	✓ ✓ ✓ ✓ ✓ très pertinent
Interferon type II[MESH] AND Polymorphism (Genetics) Limits: Human	42	✓ ✓ ✓ ✓ ✓ très pertinent
Interferon type II[MESH] AND Polymorphism (Genetics) AND "autoimmune diseases"[MESH] Limits: Human	8	✓ ✓ ✓ ✓ ✓ très pertinent

1.2.3 - Embase

Pour effectuer cette recherche, nous avons consulté Embase sur Dialog. Les CD-ROMS s'arrêtaient en juin 1999. L'interrogation a été posée de manière identique à celle formulée pour Pub Med. Toutefois nous ne sommes pas parvenus à éliminer les résultats qui font intervenir la protéine comme agent exogène.

Embase utilise également un thésaurus assez similaire au Mesh. Il est à noter que Embase répertorie des conférences et des éditoriaux contrairement à PubMed. Par contre comme PubMed, elle ne répertorie pas les brevets.

Tableau 8

	Mots-clés Emtree (Embase)
IL4	interleukin-4
Interferon gamma	gamma, interferon
mRNA	mrna ou messenger
polymorphism	polymorphism
gene expression	gene expression

- ✓ expression de gène : dosage des ARN messagers

Tableau 9

Entrée	Equations	Nombre de réponses
S1	Gamma interferon	17101
S2		51268
S3	messenger rna	52775
S4	autoimmune disease	2785
S5	autoimmune disease!	313337
S6	S1 and S2 and S3 and S5	20
S7	S6/human,de	15
S10	Interleukin 4	8831
S11	S10 and S2 and S3 and S5	-
S12	S11/human,de	15
S13	rd	14

- ✓ étude du polymorphisme

Entrée	Equations	Nombre de réponses
S1	Gamma interferon	17101
S2	Polymorphism	26912
S3	(S1 and S2)/human,de	62
S4	autoimmune disease!	313337
S5	S3 and S4	9
S6	S5/human,de	8
S7	Interleukin 4	8831
S8	S7/human,de and S2/human,de	49
S7	S8 and S4	9

II . 2 – Recherche de brevets

2.1 - Recherches préliminaires – difficultés

Les premières recherches ont été effectuées sur internet en se référant aux bases de données répertoriées par l'Urfist de Lyon et l'Insa de Lyon.
<http://urfist.univ-lyon1.fr/gratuits/cat3.html>, <http://csidoc.insa-lyon.fr/sapristi/digest.html>.

Les recherches effectuées en langage naturel apportent de nombreuses réponses et peu pertinentes.

- Beaucoup trop avec le mot "interleukin-4" placé n'importe où, parfois dans le titre et souvent dans les références bibliographiques contenues dans le brevet.
- Beaucoup de réponses mais pas spécifiques à l'interleukin-4 (certaines bases de données ne reconnaissaient pas le tiret, exemple: la base espacenet de l'european patent office)

2.2 - Détermination de la classe

L'utilisation d'une banque de données, la DNA patent database répertoriant les brevets relatifs à la génétique permettait (avant mars) de restreindre les requêtes à certains domaines. En combinant interleukin-4 ou il-4, limité à la catégorie DETKIT (qui correspondait à kit ou multikit), cinq brevets avaient pu être obtenus. Et parmi ceux-là, un nous semblait très pertinent. Nous avons donc essayé de déterminer la classe à laquelle il appartenait. Après avoir relevé les codes IPC, nous avons utilisé deux sites qui donnent accès à la classification mondiale des brevets.

<http://classifications.wipo.int/fre/main.htm>, <http://www.inpi.fr/brevet/html/rechbrev.htm>.

La classe C12Q 1/68 a pu être identifiée.

SECTION C : CHIMIE; METALLURGIE

C12 : BIOCHIMIE; BIÈRE; SPIRITUEUX; VIN; VINAIGRE; MICROBIOLOGIE; ENZYMOLOGIE; TECHNIQUES DE MUTATION OU DE GÉNÉTIQUE.

C12Q : Procédé de mesure, ou de recherche ou d'analyse faisant intervenir des enzymes ou des micro-organismes; composition à cet effet, Procédés pour préparer ces compositions.

C12 Q1/68 : faisant intervenir des acides nucléiques.

2.3 - Comparatif des BDD gratuites sur internet

Après quelques essais, il s'est vite avéré que même avec l'utilisation de la catégorie, le nombre de brevets restait très important. En effet, cette catégorie connaît un afflux considérable avec les avancées fulgurantes de la biologie moléculaire. Il est intéressant de voir la progression du nombre de brevets sur un pays : les Etats Unis.

De 1976 à 20004322 brevets.

51 brevets publiés en 1990, 223 en 1995, 963 en 1998.

De manière à optimiser la recherche, nous avons testé plusieurs bases de données gratuites sur Internet pour en sélectionner une, performante, qui pourrait nous permettre des interrogations similaires aux bases de données commerciales du type Derwent. Ainsi ce travail pourrait être plus facilement transposable aux bases questel ou derwent pour une recherche exhaustive.

Les accès aux documents

Tableau 10

bases	adresses	Années	titre	résumé	Texte intégral
inpi	http://www.inpi.fr/brevet/html/rechbrev.htm	Accès 2 dernières années de demandes de brevets françaises, européennes et internationales PCT.	Oui	Oui	Les derniers brevets sur une période de quinze jours au format pdf
upso	http://www.uspto.gov/patft/	1976 à 2000 brevets américains	Oui	Oui	Oui
ibm	http://www.patents.ibm.com/ibm.html	20 ans de brevets américains	Oui	Oui	Oui
epo	http://ep.espacenet.com/	1999-2000 WO	Oui	Oui	Non
dna	http://208.201.146.119/	1999-2000 Japan	Oui	Oui	Non
		Européens, WO, japon	Oui	Oui	Non
		?	Oui	Non	Oui

Les interrogations proposées

Tableau 11

bases	A/date	B/titre	C/revendications	D/texte	E/résumé	Recherche combinée ?
inpi	non	oui avec E	non	non	oui avec B	Recherche par classe CIB Ou Mots contenus dans le titre ou dans le résumé
upso	oui par années	oui	oui	oui	oui	Il est possible de combiner tous les champs
ibm	2	oui	oui	non	oui	Possibilité de combiner plusieurs champs (reste limitée)
epo	1	oui	non	non	oui	Mots dans le titre (titre ou résumé) ou possibilité de combiner avec la classe
dna	oui	oui	oui	oui	oui	Il est possible de combiner tous les champs

2.4 - Optimisation sur la BDD UPSO.

La base des brevets américains s'avère la plus complète. De nombreux champs sont proposés avec toutes les combinaisons possibles. Elle présente un avantage majeur : l'accès au brevet en texte intégral qui nous sera utile pour juger de la pertinence des interrogations.

En utilisant plusieurs recherches combinées du type " classe C12Q1/68 et mots dans le texte et/ou résumé et/ou titre et/ou revendications", nous avons sélectionné l'interrogation utilisant les revendications et le résumé qui semble être la plus pertinente.

Tableau 13

Entrée	Equations	Nombre de réponses	Pertinence
1 (1999-2000)	((ACLM/interleukin-4 or ACLM/il-4) or (ABST/interleukin-4 or ABST/il-4)) and ICL/C12Q001-68	6	✓ ✓
2 (1976-2000)	((ACLM/interleukin-4 or ACLM/il-4) or (ABST/interleukin-4 or ABST/il-4)) and ICL/C12Q001-68	12	✓ ✓

Faute de temps, nous n'avons pu effectuer la recherche sur la base Questel ou sur la base Derwent qui auraient pu nous donner une recherche complète.

II. 3 – Recherche de produits

3.1 - Où trouver ?

Pour cette recherche spécifique, orientée vers le domaine biomédical et surtout biologie moléculaire, il est difficile d'adopter une démarche classique qui consiste en la seule étude des brevets ou l'étude des bases de données technico-commerciales (ex : IAC prompt). Car de nombreux produits sont développés par des petites "start-ups" qui ne brevètent pas forcément.

En revanche, ces start-ups utilisent la communication sous plusieurs formes de manière à attirer les fonds d'investisseurs. Et Internet semble être un vecteur de choix pour cette diffusion d'informations.

Ma stratégie est de repérer des sites de sociétés offrant des produits commerciaux permettant d'évaluer l'expression de gène codant les cytokines. Suivant les moteurs de recherche utilisés, on utilise une requête pour chercher des pages ou bien on explore certaines catégories. Mieux, on combine les deux.

3.2 - Recherches sur internet et banques de données

3.2.1 - Recherches sur internet

Plusieurs moteurs de recherche ont été testés, la recherche est effectuée par une combinaison du type (**cytokine ou interleukin**) + **mrna** + **kit**. Le corpus de pages trouvées est gigantesque et rarement exploitable dans son ensemble. La consultation des pages nous a permis de trouver plusieurs produits commerciaux essentiellement américains provenant de petites ou moyennes sociétés.

Cette recherche n'est pas "productive", elle nécessite beaucoup de temps pour consulter les nombreuses pages proposées. La recherche est d'autant plus longue qu'il est impératif d'utiliser plusieurs moteurs de recherche. D'autre part, il semble difficile d'améliorer la requête. En effet, l'étude des différentes pages obtenues concernant les produits commerciaux ne permet pas de déterminer un meilleur profil.

Moteurs testés et approuvés:

<http://www.google.com/>
<http://www.alphasearch.org/>
<http://www.northernlight.com/>
<http://www.av.com/>
<http://www.yahoo.com/>
<http://www.excite.com/>
<http://www.about.com/>

Seul northernlight permet une recherche plus facile, en permettant à l'issue de la recherche de restreindre à des sujets précis. Mais comme toutes les autres elle n'est pas exhaustive.

Il semble plus intéressant de rechercher dans les catégories. Les sociétés de biotechnologies sont listées dans la catégorie biologie et il est possible de repérer des sites intéressants d'après leur description.

3.2.1 - Recherches sur bdd

Trois bases ont été rapidement évaluées : Prompt, Biobusiness et Biocommerce, disponibles sur dialog. La première concerne surtout les événements et peut donner de précieux renseignements sur les sociétés, les deux autres comportent beaucoup d'articles scientifiques.

Avec une recherche du type (interleukin-4 or il-4) and mrna and human, seule une référence de produit de diagnostic a pu être trouvée sur 50 consultées. La référence étant très ancienne, l'étude n'a pas été poursuivie.



II. 3 – Bilan

Cette recherche passionnante et très variée a surtout été coûteuse en temps.

Temps estimé : Internet 80 heures (y compris PubMed)
 CD-ROMS 8 heures
 BDD dialog 3 heures
 Accès au documents primaires 4 heures
 Traitement 50 heures

Total : 145 heures

Coût 400 F pour Embase
 150 F pour prompt, biobusiness et biocommerce
 100 F pour les documents originaux

III – Synthèse Bibliographique

III. 1 – Introduction

1.1 - Les maladies auto-immunes : problème de diagnostic

Les maladies auto-immunes sont des affections associées à la présence d'auto-anticorps dans l'organisme du malade. Le sujet fabrique des anticorps contre les propres structures de son corps (ex : la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux systémique).

L'établissement d'un diagnostic et le traitement précoce des maladies autoimmunes et inflammatoires chroniques restent limités par la difficulté à identifier les agents responsables de la maladie.

1.2 - Les cytokines

Plusieurs observations, comme l'amélioration de la polyarthrite rhumatoïde ou inversement l'augmentation des poussées de lupus érythémateux disséminé lors de la grossesse indiquent que la réponse immunitaire n'est pas figée et qu'une maladie chronique pourrait être équilibrée sous l'action d'agents non spécifiques comme les **cytokines**.

Les cytokines représentent une famille de molécules polypeptidiques de faible masse moléculaire, généralement glycoprotéiques. Elles sont libérées par de très nombreuses cellules activées (mastocytes, lymphocytes T ou B) au cours des processus immunitaires et inflammatoires.

On distingue deux types de cytokines associées aux lymphocytes T :

- Les cytokines de type I (Th1) sont l'interleukine-2, l'interferon-gamma, le "tumour necrosis factor" (TNF- β). Elles stimulent l'immunité à médiation cellulaire, l'hypersensibilité retardée, l'activation des monocytes favorisant la production de cytokines proinflammatoires. *Ce profil Th1 est retrouvé dans des maladies chroniques comme la thyroïdite ou la polyarthrite rhumatoïde.*
- Les cytokines de type II (Th2) sont l'interleukine-4, l'interleukine-3, l'interleukine-5 et l'interleukine-10. Elles stimulent l'immunité à médiation humorale, la production d'anticorps, inactivent les monocytes et inhibent la production de cytokines proinflammatoires. *L'augmentation de cytokines de type II est associée aux maladies allergiques.*

1.3 - La polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde est le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires chroniques. Elle touche environ 0,5% de la population. Son origine précise est inconnue, elle est classée comme une maladie autoimmune à cause de la présence de signes d'autoréactivité. Elle se caractérise par une inflammation chronique de la membrane synoviale articulaire qui entraîne progressivement la destruction de l'os et du cartilage.

Plusieurs facteurs favorisant la maladie ont été identifiés:

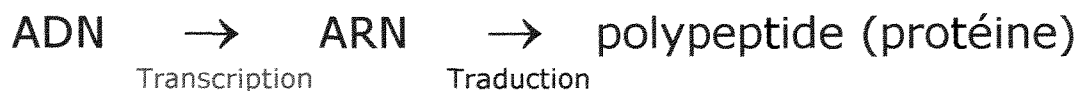
- Hormonaux : Elle touche quatre fois plus souvent la femme (amélioration durant la grossesse).
- Génétiques : Liaison incomplète avec les gènes HLA DR4 et HLA DR1.
- Environnementaux : On suspecte l'intervention d'antigènes infectieux bactériens ou viraux.

Son diagnostic est difficile et ne devient évident que lorsque la maladie a déjà occasionné des lésions comme par exemple des déformations. A ce stade, le traitement de la maladie devient alors moins efficace.

Un diagnostic précoce pourrait être élaboré en mesurant l'expression de cytokines telles que **l'interleukine-4** ou l'interleukine-10. Toutes deux ayant un effet anti-inflammatoire et étant reconnues comme localement déficitaires dans la polyarthrite rhumatoïde.

1.4 - L'expression de gène

L'expression de gène ou l'expression de l'information génétique dans toutes les cellules est un système essentiellement unidirectionnel. L'ADN détermine la synthèse de l'ARN qui à son tour détermine la synthèse de polypeptides qui formeront les protéines.



Le produit initial de la transcription ou transcrit primaire est soumis à des mécanismes de maturation de l'ARN au cours duquel la plus grande partie de l'ARN initial est éliminée pour donner naissance à un ARN messager beaucoup plus petit. C'est ce dernier qui déterminera la synthèse de polypeptides.

1.5 - Quantification de l'expression de gène

1.5.1 - Dosage de la protéine

L'expression de gène peut être quantifiée par **dosage de la protéine**, soit en mettant en oeuvre des **méthodes biologiques** qui rendent compte de l'activité biologique de ces molécules ou bien par **dosages immunologiques**. Ces derniers utilisent des anticorps : un pour piéger la protéine, puis un autre pour la révélation. Si cette méthode est éprouvée dans de nombreux cas, elle pose de réels problèmes lorsqu'elle est appliquée aux cytokines. En effet, les cytokines exercent leur activité biologique à des concentrations très faibles, leur exploration s'avère donc très délicate surtout si en plus on doit déterminer un déficit de cytokines. D'autre part, les dosages doivent être faits avec de nombreuses précautions car les cytokines sont très réactives. Il existe souvent des interférences entre protéines et **le problème majeur reste la standardisation de la méthode**.

1.5.2 - Dosage de l'ARN messenger

La quantification des ARN messagers semble plus efficace. Deux techniques sont utilisées :

- **L'hybridation** qui utilise des sondes d'acides nucléiques spécifiques ou d'oligonucléotides. L'avantage de cette méthode est de définir des profils d'expression dans l'espace.
- ou bien la "reverse transcriptase - polymerase chain reaction" plus connue sous le nom de **RT-PCR** qui présente plusieurs avantages majeurs tels que sa rapidité, sa sensibilité et sa simplicité.

III.2 – Expression de gène IL-4 et INF-gamma

2.1 - Mesure de l'ARN messenger de l'interleukine 4 dans la PR

L'expression de l'IL-4 dans la PR par dosage des ARN messagers a été menée dans plusieurs études effectuées sur des cellules du sang **(1-4)** ou provenant du liquide synovial **(2,4-6)**.

Toutes utilisent la RT-PCR ou la PCR. D'une manière générale, la détection pose problème. Les résultats obtenus sont même parfois contradictoires. De façon arbitraire en estimant que le temps est synonyme d'amélioration dans la technique... Nous nous attarderons sur les derniers résultats.

Quelques observations se dégagent, la production d'IL-4 peut être détectée dans le sang **(1-4)** ou dans le liquide synovial **(2,4,5)**. Elle est plus faible chez les patients atteints de PR que chez les volontaires sains **(1)**. Elle est d'ailleurs souvent faiblement **(3,4)** ou non détectée **(6)**.

2.2 - Mesure de l'ARN messenger de l'interferon-gamma dans la PR

Le dosage de l'ARN messenger de l'interferon gamma semble plus évident que celui de l'IL-4. Il est présent en plus grande quantité. Il a pu être analysé dans les cellules du sang **(1,2,4,8)** ou dans les cellules du liquide synovial **(2,5-8)**.

L'expression de l'interferon gamma est quelque fois plus élevée chez certains patients **(7,8)**, les derniers travaux montrent des taux similaires chez le patient atteint de RA et chez le volontaire sain **(1)**. L'expression est plus importante dans les cellules du liquide synovial que dans les cellules du sang **(6)**. Il est à noter que l'expression est systémique, les prélèvements effectués sur les deux genoux des patients présentent le même profil d'expression de gène **(5)**.

2.3 - Polymorphisme

Des études antérieures **(12)** ont montré que la PR est associée à l'allèle HLA-DR4. Toutefois seuls 30 à 50% des patients présentent cette particularité.

Une étude récente **(13)** a été menée récemment pour savoir si l'expression faible du gène IL4 était due à une prédisposition génétique. L'étude cherchait à mettre en évidence des associations entre polymorphismes de plusieurs gènes de cytokines et l'évolution de la maladie. **L'étude semble indiquer une association entre la maladie et un polymorphisme situé en 5q31-33 sur le gène IL-4.**

Pas d'association entre les polymorphismes identifiés et la rémission, par contre plusieurs ont pu être associés avec l'évolution de la maladie vers le phénomène érosif. En particulier pour le gène IL-4 la fréquence élevée de deux allèles IL-4 RP1/IL-4 -590*T est observée dans plusieurs cas étudiés.

Les auteurs estiment, si ces résultats sont confirmés, que 30.8% des patients pourraient être identifiés.

2.4 - Conclusion

En combinant l'examen de plusieurs cytokines impliquées dans la polyarthrite rhumatoïde (PR), les tests génétiques devraient permettre à terme d'améliorer le diagnostic de la PR. La détection des ARN messagers reste toutefois le problème sensible surtout pour l'interleukine 4.

III. 4 – Quelques produits commerciaux

Plusieurs produits commerciaux destinés à des études de recherche sont déjà commercialisés. La plupart utilise la technique RT-PCR. Quelques produits pour l'hybridation sont disponibles. Et commencent à apparaître

les "arrays" alignements de centaines de gènes greffés qui permettent d'étudier l'expression de ces gènes dans différentes conditions (ex : effet d'une molécule, d'une protéine, etc...).

4.1 - PCR

"Cytokine Quantitative PCR Expression Assays" par la société *Lark Technologies* **(12)**

IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-12, p35, IL-12 p40, IL-15, INFg, TNFa.

"Cytokine RT-PCR Kits" par la société *Roche Molecular Biochemicals* **(13)**

IL-1b, IL-2, IL-4, IL-10, INFg, TNFa.

"Th1/Th2 cytokine MPCR Kit" par la société *Maxim biotech* **(14)**

INF-r, IL-2, IL-4, IL-10, IL-5, IL-12p40, IL-13.

"Cytokine Genotyping Tray" par la société *One Lambda* **(15)**

TGFb, TNFa, IL-10, IL-6, INFg.

4.2 - Hybridation

"Quantikine® mRNA" par R&D Systems **(16)**

"mRNA assays" par Oncogène **(17)**

4.3 - Les arrays

"Cytokine Expression Array" de R&D systems **(18)**

378 cDNA de cytokines immobilisés.

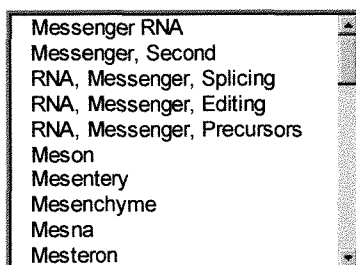
"Atlas Human cDNA Expression Array I" par la société Clontech **(19)**

588 cDNA immobilisés.

ANNEXE 1

Question posée au MESH : messenger

No exact match for your term was found. Please select from the following possibilities:



Messenger RNA
Messenger, Second
RNA, Messenger, Splicing
RNA, Messenger, Editing
RNA, Messenger, Precursors
Meson
Mesentery
Mesenchyme
Mesna
Mesteron

[Browse this term](#)

ANNEXE 2

mrna is not a MeSH term, but it is associated with the MeSH term **RNA, Messenger**

RNA, Messenger [[Detailed display](#)]

RNA sequences that serve as templates for protein synthesis. Bacterial mRNAs are generally primary transcripts in that they do not require post-transcriptional processing. Eukaryotic mRNA is synthesized in the nucleus and must be exported to the cytoplasm for translation. Most eukaryotic mRNAs have a sequence of polyadenylic acid at the 3' end, referred to as the poly(A) tail. The function of this tail is not known for certain, but it may play a role in the export of mature mRNA from the nucleus as well as in helping stabilize some mRNA molecules by retarding their degradation in the cytoplasm.

this term to the Search using operator:

[All MeSH Categories](#)

[Chemicals and Drugs Category](#)

[Nucleic Acids, Nucleotides, and Nucleosides](#)

[Nucleic Acids](#)

[RNA](#)

RNA, Messenger

[Codon](#)

[Codon, Initiator](#)

[Codon, Nonsense](#)

[Codon, Terminator](#)

[RNA Caps](#)

[RNA Cap Analogs](#)

[Untranslated Regions](#)

[3' Untranslated Regions](#)

[5' Untranslated Regions](#)

ANNEXE 3

RNA, Messenger [\[Brief display\]](#)

RNA sequences that serve as templates for protein synthesis. Bacterial mRNAs are generally primary transcripts in that they do not require post-transcriptional processing. Eukaryotic mRNA is synthesized in the nucleus and must be exported to the cytoplasm for translation. Most eukaryotic mRNAs have a sequence of polyadenylic acid at the 3' end, referred to as the poly(A) tail. The function of this tail is not known for certain, but it may play a role in the export of mature mRNA from the nucleus as well as in helping stabilize some mRNA molecules by retarding their degradation in the cytoplasm.

Year introduced: 1965

this term/subheadings to the Search using operator:

☐ administration and dosage ☐ analogs and derivatives ☐ analysis ☐ antagonists and inhibitors
☐ biosynthesis ☐ blood ☐ cerebrospinal fluid ☐ chemical synthesis ☐ chemistry ☐ classification
☐ deficiency ☐ diagnostic use ☐ drug effects ☐ genetics ☐ history ☐ immunology ☐ isolation and
purification ☐ metabolism ☐ pharmacokinetics ☐ pharmacology ☐ physiology ☐ radiation effects
☐ secretion ☐ standards ☐ therapeutic use ☐ toxicity ☐ ultrastructure ☐ urine

☐ Restrict Search to Major Topic headings only

☐ Do Not Explode this term (i.e., do not include MeSH terms found below this term in the MeSH tree).

All MeSH Categories

Chemicals and Drugs Category

Nucleic Acids, Nucleotides, and Nucleosides

Nucleic Acids

RNA

RNA, Messenger

Codon

Codon, Initiator

Codon, Nonsense

Codon, Terminator

RNA Caps

RNA Cap Analogs

Untranslated Regions

3' Untranslated Regions

5' Untranslated Regions

Bibliographie

1. Loubet-Lescoulie P., Constantin A., Mazieres B., et al. Decreased peripheral blood T cell cytokine gene expression rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.*, 1999, vol 28, n°4, p 244-251.

2. Stonans I., Stonane E., Vogelsang H., et al. Differential expression of cytokine genes in CD27-positive and -negative CD4 lymphocyte subsets from healthy humans and rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol. Int.*, 1996, vol 15, n°6, p 249-254.

3. Rivas D., Mozo L., Zamorano J., et al. Upregulated expression of IL-4 receptors and increased levels of IL-4 in rheumatoid arthritis patients. *J. Autoimmun.*, 1995, vol 8, n°4, p 587-600.

4. Chen E., Keystone E.C., Fish E.N. Restricted cytokine expression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1993, vol 36, n°7, p 901-910.

5. Sew Hoy M.D., Williams J.L., Kirkham B.W. Symmetrical synovial fluid cell cytokine messenger RNA expression in rheumatoid arthritis: Analysis by reverse transcription/polymerase chain reaction. *Br. J. Rheumatol.*, 1997, vol 36, n°2, p 170-173.

6. Bucht A., Larsson P., Weisbrot L., et al. Expression of interferon-gamma (IFN-gamma), IL-10, IL-12 and transforming growth factor-beta (TGF-beta) mRNA in synovial fluid cells from patients in the early and late phases of rheumatoid arthritis (RA). *Clin. Exp. Immunol.*, 1996, vol 103, n°3, p 357-367.

7. Waalen K., Sioud M., Natvig J.B., et al. Spontaneous in vivo gene transcription of interleukin-2, interleukin-3, interleukin-4, interleukin-6, interferon-gamma, interleukin-2 receptor (CD25) and proto-oncogene c-myc by rheumatoid synovial T lymphocytes. *Scand. J. Immunol.*, 1992, vol 36, n°6, p 865-873.

8. Maurer D., Felzmann T., Holter W., et al. Evidence for the presence of activated CD4 T cells with naive phenotype in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.*, 1992, vol 87, n°3, p 429-434.

9. Firestein G.S., Alvaro-Gracia J.M., Maki R. Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.*, 1990, vol 144, n°9, p 3347-3353.(erratum in *J. Immunol.*, 1990, vol 145, n°3, p 1037).

10. Weyand M.C., Klimiuk P.A., Goronzy J.J. Heterogeneity of rheumatoid arthritis : From phenotypes to genotypes. *Springer Semin. Immunopathol.*, 1998, vol 20, n°1-2, p 5-22.

11. Cantagrel A., Navaux F., Loubet-Lescoulie P., et al. Interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1999 vol 42, n°6, p 1093-1100.

Sites commerciaux

12. Lark Technologies – Bulletins: Human Cytokines

<http://www.lark.com/b-cytokine.html>, dernière visite le 24 janvier 2000.

13. RT-PCR Kits

<http://biochem.roche.com/techserv/ttip0798.htm>, dernière visite le 11 mars 2000.

14. Multiplex PCR

<http://www.maximbio.com/th12-mxxx.htm>, dernière visite le 11 mars 2000.

15. Cytokine Genotyping Tray

<http://www.onelambda.com/prod/research/cytokine/index.html>

16. The Cytokine Bulletin – New Tools: Quantitative mRNA

<http://www.rndsystems.com/cb/cbsu99a6.html>, dernière visite le 15 février 2000.

17. Products: Spotlight

<http://www.oncresprod/products/spot-mrna.asp>, dernière visite le 11 mars 2000.

18. The Cytokine Bulletin – Cytokine Expression Array

<http://www.rndsystems.com/cb/cbsu99a8.html>, dernière visite le 15 février 2000.

19. Atlas Human cDNA Expression Array I

<http://www.clontech.com/archive/apr97UPD/Atlas.html>, dernière visite le 15 février 2000.