



République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة أبو بكر بلقايد - تلمسان

Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEM

كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون



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

Département de Biologie

Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie W04144100

## MÉMOIRE

Présenté par

**BELAYACHI Chaimaa**

**MERABET Merwa**

*En vue de l'obtention du*

**Diplôme de MASTER**

En Immunologie

### Thème

Conception des amorces pour les gènes *IL6* et *NFKB1* exprimés par les macrophages dans le but d'étudier l'effet de la vitamine D sur la destruction du *Mycobacterium tuberculosis*.

Soutenu le 29 juin 2025, devant le jury composé de :

Présidente	MILIANI Maroua	MCB	Université de Tlemcen
Encadrante	NOUARI Wafa	MCB	Université de Tlemcen
Examinatrice	LAISSOUF Ahlem	MCA	Université de Tlemcen

Année universitaire 2024/2025

## Résumé

**Introduction :** *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), une bactérie à Gram positif intracellulaire, responsable de la tuberculose chez l'être humain, cible essentiellement les macrophages. Ces cellules le facteur de transcription *NF-κB*, qui contrôle la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine 6 (*IL6*). Par ailleurs, la vitamine D développe la réaction immunitaire en favorisant la fabrication de peptides antimicrobiens tels que la cathélicidine et en contrôlant l'activité de *NF-κB* et d'*IL6*.

**Objectif :** L'objectif de ce travail est de concevoir des amorces spécifiques aux gènes *IL6* et *NFKB1* exprimés par le macrophage afin de quantifier par PCR leur expression lors de l'infection par *M. tuberculosis*.

**Matériel et méthodes :** Une analyse bio-informatique a été menée afin d'identifier la séquence du gène *IL6* et *NFKB1* à partir de la base de données disponible sur le site ensembl.org. Ensuite, l'outil Primer-BLAST de la plateforme NCBI a été utilisé pour concevoir une paire d'amorce optimales. La spécificité de ces amorces a été validée par une analyse PCR in silico.

**Résultats :** À l'aide de l'outil Primer-BLAST, des amorces spécifiques ciblant le gène *IL6* et *NFKB1* ont été conçues.

Pour le gène *IL6*, les séquences d'amorces retenues sont : l'amorce sens "AGAGGACCACCGTCTCTGTT" et l'amorce antisens "GTCTCCAGGTGGAGTGTGTG", générant un amplicon de 867 pb. Les températures de fusion ( $T_m$ ) associées sont respectivement de 59,32 °C pour l'amorce sens et 60,18 °C pour l'amorce antisens. Chaque amorce a une longueur de 20 nucléotides et une composition en bases GC de 55 %.

Concernant le gène *NFKB1* les amorces sélectionnées sont : "TTGCCTCTTCACCACACAGA" (amorce sens) et "GGCAGCAGAGGGATGTTTCT" (amorce antisens), permettant l'amplification d'un fragment de 739 pb. Les températures de fusion sont de 59,16 °C pour l'amorce sens et 60,03 °C pour l'amorce antisens. Il est également possible que ces amorces aient une longueur de 20 nucléotides, présentant un taux de GC de 50 % pour l'amorce dans le sens direct et de 55 % pour l'antisens

**Conclusion :** Le choix minutieux des amorces pour la PCR ciblant les gènes *IL6* et *NFKB1* est essentiel pour garantir le succès de l'expérimentation et enrichir notre connaissance de leur rôle dans la réaction immunitaire aux infections.

**Mots clé :** *Mycobacterium tuberculosis*, Macrophage, *IL6*, *NF-κB*, Primer-blast, amorce.

**Abstract**

**Introduction:** *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), an intracellular Gram-positive bacterium responsible for tuberculosis in humans, primarily targets macrophages. These cells contain the transcription factor *NF-κB*, which controls the production of pro-inflammatory cytokines such as interleukin 6 (IL-6). Furthermore, vitamin D enhances the immune response by promoting the production of antimicrobial peptides like cathelicidin and by regulating the activity of *NF-κB* and *IL6*.

**Objective:** The objective of this study is to design specific primers for the *IL6* and *NFKB1* genes, expressed in macrophages, to quantify their expression by PCR during *M. tuberculosis* infection.

**Materials and Methods :** A bioinformatics analysis was conducted to identify the sequences of the *IL6* and *NFKB1* genes from the database available on the Ensembl website [ensembl.org](http://ensembl.org). Subsequently, the Primer-BLAST tool on the NCBI platform was used to design an optimal primer pair. The specificity of these primers was validated by *in silico* PCR analysis.

**Results:** Using the Primer-BLAST tool, specific primers targeting the *IL6* and *NFKB1* genes were designed.

For the *IL6* gene, the selected primer sequences are the forward primer "AGAGGACCACCGTCTCTGTT" and the reverse primer "GTCTCCAGGTGGAGTGTGTG", generating an 867 bp amplicon. The respective melting temperatures ( $T_m$ ) are 59.32°C for the forward primer and 60.18°C for the reverse primer. Each primer is 20 nucleotides long with a GC content of 55%.

For the *NFKB1* gene, the selected primers are: "TTGCCTCTTCACCACACAGA" (forward primer) and "GGCAGCAGAGGGATGTTTCT" (reverse primer), which amplify a 739 bp fragment. The melting temperatures are 59.16°C for the forward primer and 60.03°C for the reverse primer. These primers are also 20 nucleotides long, with a GC content of 50% for the forward primer and 55% for the reverse primer.

**Conclusion:** The careful selection of primers for PCR targeting the *IL6* and *NFKB1* genes is essential to ensure the success of the experiment and to enrich our knowledge of their role in the immune response to infections.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, Macrophage, *IL6*, *NF-κB*, Primer-blast, primer.

## الملخص

**المقدمة:** المتفطرة السلية (*Mtb*)، وهي بكتيريا داخل خلوية موجبة الجرام مسؤولة عن مرض السل لدى البشر، تستهدف بشكل رئيسي الخلايا البلعمية. تعتمد هذه الخلايا على عامل النسخ عامل النسخ *NF-κB*، الذي يتحكم في إنتاج السيتوكينات المسببة للالتهابات مثل الإنترلوكين 6 (*IL6*). علاوة على ذلك، يُعزز فيتامين د الاستجابة المناعية من خلال تحفيز إنتاج الببتيدات المضادة للميكروبات مثل الكاثليسيدين، وتنظيم نشاط *NF-κB* و *IL6*.

**الهدف:** الهدف من هذا العمل هو تصميم بادئات خاصة بجينات *IL6* و *NFKB1* التي يعبر عنها البلاعم من أجل تحديد كمية التعبير عنها بواسطة تفاعل البوليميراز المتسلسل أثناء الإصابة بمرض السل.

**المواد والطرق:** أُجري تحليل معلوماتي حيوي لتحديد تسلسل جينات *IL6* و *NFKB1* من قاعدة البيانات المتاحة على الموقع الإلكتروني [ensembl.org](http://ensembl.org) بعد ذلك، استُخدمت أداة Primer-BLAST من منصة NCBI لتصميم زوج بادئات مثالي. وتم التحقق من دقة هذه البادئات من خلال تحليل تفاعل البوليميراز المتسلسل الحاسوبي (*in silico PCR*).

**النتائج:** باستخدام أداة Primer-BLAST، صُممت بادئات محددة تستهدف جينات *IL6* و *NFKB1*.

بالنسبة لجين *IL6*، تسلسلات البادئات المختارة هي: البادئ الأمامي "AGAGGACCACCGTCTCTGT" والبادئ العكسي "GTCTCCAGGTGGAGTGTGTG"، مما يُنتج أمبليكون بطول 867 زوجًا قاعديًا. درجات حرارة الانصهار (*Tm*) للبادئ الأمامي هي 59.32 درجة مئوية و 60.18 درجة مئوية للبادئ العكسي. يتكون كل بادئ من 20 نيوكليوتيدًا، ومحتوى GC بنسبة 55%.

بالنسبة لجين *NFKB1*، البادئات المختارة هي: "TTGCCTTTCACCACACAGA" (البادئ الأمامي) و "GGCAGCAGAGGGATGTTTCT" (البادئ العكسي)، مما يُضخّم جزءًا بطول 739 زوجًا قاعديًا. تبلغ درجات انصهار البادئ الأمامي 59.16 درجة مئوية، بينما تبلغ درجة انصهار البادئ العكسي 60.03 درجة مئوية. يتكون هذان البادئان أيضًا من 20 نيوكليوتيدًا، ومحتوى كروماتوغرافيا كربونية 50% للبادئ الأمامي و 55% للبادئ العكسي.

**الاستنتاج:** إن الاختيار الدقيق للبادئات لتفاعل البوليميراز المتسلسل لجينات *IL6* و *NFKB1* هو خطوة أساسية لضمان نجاح التجربة وفهم دورها في الدفاع المناعي ضد العدوى بشكل أفضل.

**الكلمات المفتاحية:** المتفطرة السلية، الخلايا البلعمية، *NF-κB*، *IL6* برايمر بلاست، مواد أولية

## Avant-propos

Avant tout, nous tenons à exprimer notre sincère gratitude envers Allah. C'est grâce à Sa guidance, son courage que nous avons pu mener à bien nos études et atteindre cet accomplissement.

En termes de ce mémoire, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à notre encadrante, Madame NOUARI Wafa, maîtresse de conférences de classe B au département de Biologie à l'Université de Tlemcen. Ses conseils clairs, sa présence et sa méthode rigoureuse ont été très importants pour ce projet. Son aide a été une grande source de motivation et nous a beaucoup appris. Nous lui sommes reconnaissants pour sa confiance, ses commentaires constructifs et son soutien durable. Ses remarques pertinentes et ses explications claires ont vraiment amélioré la qualité de ce mémoire.

Nous remercions sincèrement les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Leur temps, leur expertise et leurs retours critiques sont d'une valeur inestimable pour notre parcours.

Nous tenons également à exprimer notre gratitude à l'ensemble des enseignants de l'Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen, ainsi qu'à toute l'équipe du laboratoire Biomolim. Les connaissances qu'ils nous ont transmises durant ces cinq années ont été fondamentales pour notre parcours et l'élaboration de ce mémoire.

*Je dédie ce travail à :*

*Mes chers parents, ma sœur et mon frère, qui toujours présents et essentiels à ma vie, et à toute ma famille. Jours mes amies*

*Meriem, Fatima Zohra, Merwa, Nawal et Rania.*

*Enfin, je remercie toute personne qui m'a aidé. Merci infiniment.*

*Chaimaa.*

*Je dédie ce mémoire à mes chers parents, pour leur amour, leur soutien inconditionnel et leurs encouragements constants tout au long de mon parcours.*

*À mes sœurs Amel, Hayat, Safaa, Manel pour leur soutien moral.*

*À tous mes amis, pour les bons moments partagés, le soutien et les longues heures d'étude. Merci à vous du*

*fond du cœur.*

*Merwa.*

## Table des matières

Résumé .....	III
Abstract.....	IV
الملخص .....	V
Avant-propos .....	VI
Table des matières .....	VII
LISTE DES FIGURES .....	IX
Liste des tableaux.....	XI
Liste des abréviations .....	XIII
Introduction.....	1
Chapitre 1. Revue de la littérature.....	2
1.1. Calciférol.....	2
1.1.1. Historique .....	2
1.1.2. Définition.....	3
1.1.3. Origine de calciférol.....	3
1.1.4. Sources de calciférol .....	4
1.1.5. Processus biochimiques .....	4
1.1.6. Récepteur de la vitamine D .....	5
1.1.7. Effets de calciférol .....	6
1.2. Macrophage.....	12
1.2.1. Généralité.....	12
1.2.2 Origine.....	12
1.2.3. Profil phénotypique.....	14
1.2.4. Fonctions des macrophages dans l'auto-immunité, immunité antitumorale et anti-infectieuse .....	17
1.3. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	21
1.3.1. Définition.....	21
1.3.2. Taxonomie .....	21
1.3.3. Caractéristiques morphologiques et biochimiques .....	21
1.3.5. Pathogénicité.....	22
1.3.6. Cycle de l'infection .....	22
1.3.7. Facteurs de virulence de <i>M. tuberculosis</i> .....	24

---

1.3.8. Réponse immunitaire innée contre <i>Mycobacterium tuberculosis</i> et rôle de la vitamine D.....	26
1.4. PCR.....	28
1.4.1. Définition.....	28
1.4.2. Principe de la PCR .....	29
1.4.3. Composants de la PCR.....	30
1.4.4. Les étapes de la PCR .....	31
1.4.5. Visualisation des résultats de la PCR.....	32
1.5. Problématique et objectifs.....	34
1.5.1. Problématique .....	34
1.5.2. Objectif.....	34
1.5.3. But .....	34
<b>Chapitre 2. Matériel et méthodes .....</b>	<b>35</b>
2.1. Conception d'amorces .....	35
2.2. Outils.....	35
2.3. Conception des amorces pour amplifier le gène <i>IL6</i> .....	38
2.3.1. Description du gène <i>IL6</i> .....	38
2.3.2. Détermination de la séquence du gène <i>IL6</i> .....	38
2.3.3. Le design des Primer : L'outil Primer-BLAST .....	41
2.3.4. Confirmation des résultats par <i>In-Silico</i> PCR .....	43
2.4. Conception des amorces pour amplifier le gène <i>NFKB1</i> .....	44
2.4.1. Description de gène <i>NFKB1</i> .....	44
2.4.2. Détermination de la séquence du gène <i>NFKB1</i> .....	44
2.4.3. Confirmation des résultats par <i>In-Silico</i> PCR .....	46
<b>Chapitre 3. Résultats .....</b>	<b>47</b>
3.1. Résultats de la conception des amorces pour le gène <i>IL6</i> .....	47
3.1.1. Résultats du Primer-BLAST .....	47
3.1.2. Résultats d' <i>In-silico</i> PCR du gène <i>IL6</i> .....	49
3.2. Résultats de la conception des amorces du gène <i>NFKB1</i> .....	50
3.2.1. Résultats du Primer-BLAST .....	50
3.2.2. Résultats d' <i>In-silico</i> PCR du gène <i>NFKB1</i> .....	51
<b>Chapitre 4. Conclusions et perspectives.....</b>	<b>53</b>
<b>Chapitre 5. Bibliographie.....</b>	<b>54</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1.	Différences structurales entre la vitamine D2 et la vitamine D3.	4
Figure 1.2.	Métabolisme de la vitamine D3.	5
Figure 1.3.	Fonctions du VDR.	6
Figure 1.4.	Actions du calcitriol.	8
Figure 1.5.	Effets de calciférol dans le système immunitaire.	11
Figure 1.6.	Capacités de transformation et propriétés fonctionnelles des macrophages	14
Figure 1.7.	Phénotype set polarisation de macrophage.	16
Figure 1.8.	Représentation schématique du cycle de vie de <i>M. tuberculosis</i> .	24
Figure 1.9.	Principe de la technique PCR.	29
Figure 2.1.	Localisation de gène <i>IL6</i> .	38
Figure 2.2.	La base de données Ensembl.	39
Figure 2.3.	Résultats de la recherche du gène <i>IL6</i> .	39
Figure 2.4.	Les caractéristiques du gène <i>IL6</i> .	39
Figure 2.5.	La séquence du gène <i>IL6</i> par la plateforme Ensemble.	40
Figure 2.6.	La séquence de l'exon 1 du gène <i>IL6</i> .	40
Figure 2.7.	Le site NCBI.	41
Figure 2.8.	L'outil primer-BLAST.	41
Figure 2.9.	La page d'accueil de primer-blast.	42
Figure 2.10.	Paramètres pour vérifier la spécificité des paires d'amorces.	42
Figure 2.11.	Plateforme du site « genome.ucsc.edu ».	43
Figure 2.12.	Le site <i>In-silico</i> PCR.	43
Figure 2.13.	Localisation de gène <i>NFKB1</i> .	44
Figure 2.14.	Les caractéristiques du gène <i>NFKB1</i> .	45
Figure 2.15.	La séquence du gène <i>NFKB1</i> par la plateforme Ensemble.	45

---

<b>Figure 2.16.</b>	La séquence de l'exon 12 du gène <i>NFKB1</i> .	46
<b>Figure 3.1.</b>	Résultat de l'outil Primer-blast.	47
<b>Figure 3.2.</b>	Primer pair 3.	47
<b>Figure 3.3.</b>	Primer pair 10.	48
<b>Figure 3.4.</b>	Résultats du primer-BLAST.	48
<b>Figure 3.5.</b>	Résultats du primer-BLAST.	49
<b>Figure 3.6.</b>	Confirmation des résultats sur la plateforme « UCSC genome browser ».	49
<b>Figure 3.7.</b>	Résultats de la confirmation.	50
<b>Figure 3.8.</b>	Résultats du l'outil primer-BLAST.	50
<b>Figure 3.9.</b>	Résultats de Primer-BLAST.	51
<b>Figure 3.10.</b>	Résultats de Primer-BLAST.	51
<b>Figure 3.11.</b>	Confirmation des résultats sur la plateforme « UCSC genome browser ».	52
<b>Figure 3.12.</b>	Résultats de la confirmation.	52

---

**Liste des tableaux**

<b>Tableau 1.1.</b>	Principale source alimentaire de la vitamine D3.	4
<b>Tableau 1.2</b>	Cellule immunitaire et non immunitaire qui exprime le VDR.	7
<b>Tableau 1.3</b>	Types de macrophage et leurs fonctions.	13
<b>Tableau 2.1</b>	Principaux facteurs influençant l'efficacité des amorces.	35
<b>Tableau 2.2</b>	Les outils bio-informatique qui utilisé pour la conception d'amorces.	36

## Liste des abréviations

**A**

ADDC : cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps

ARN : acide ribonucléique

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

**C**

CMH-II : complexe majeur d'histocompatibilité II

Ca<sup>2+</sup> : calcium

CSH : cellule souches hématopoïétique

CD : cluster de différenciation

CCL : CC chemokine ligand

CXCL : chemokine (C-X-C motif) ligand

CCR : C-C chemokine receptor

CLR : C-type-lectin receptors

CPA : cellule présentatrice d'antigène

**D**

DBP : vitamin D binding protein

dNTP : désoxynucléosides triphosphates

DC : cellule dendritique

**E**

EMPs : erythro-myeloid progenitors

EtBr : Ethidium bromide

**F**

FC $\delta$  : FC gamma receptor

**I**

ILC : cellule lymphoïde innée

IgG : immunoglobuline G

IgM : immunoglobulines M

iNOS : inducible nitric oxide syntase

IL : interleukine

IFN- $\delta$  : interféron-gamma

**L**

LPS : lipopolysaccharide

LAM : liporabinomannane

**M**

M1 : macrophage classiquement activé pro-inflammatoire

M2 : macrophage alternativement activé anti-inflammatoire

MTB : Mycobacterium tuberculosis

Mg<sup>2+</sup> : magnésium

**N**

NF- $\kappa$ B : facteur nucléaire kappa B

NK : naturel killer

NO : monoxyde d'azote

NLR : NOD-like receptors

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrogène

NCBI: National Center for Biotechnology Information

**P**

PRR : pattern recognition receptor  
PO<sub>3-4</sub> : phosphate  
PAMPs : pathogen-associated  
molecular pattern molecule  
PD-1 : Protéine de mort cellulaire programmée 1  
PD-L1 : ligand de mort cellulaire programmée 1  
PDGF : facteur de croissance dérivé  
des plaquettes  
PDIM : Phthiocerol dimycocérosates  
PCR : réaction en chaîne par polymérase  
PtpA : protein tyrosine phosphatase activator  
pknG : protein kinase G  
pb: pair de base

**Q**

qPCR : Quantitative PCR

**R**

ROS : reactive oxygen species  
RT-PCR : reverse transcriptase-polymerase-  
chain reaction  
RxR : récepteur X des rétinoïdes

**S**

SOCS3 : supprimeur de la signalisation  
des cytokines 3

**1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>** : 1,25-dihydroxy-vitamine D<sub>3</sub> ou calcitriol

**25(OH)D<sub>3</sub>** : 25OH vitamine D<sub>3</sub> ou calcidiol

**T**

TB : tuberculose  
Treg : lymphocyte T régulateur  
Th : lymphocyte T helper  
TLR: toll-like-receptor  
TNF- $\alpha$  : facteur de nécrose tumorale alpha  
TGF- $\beta$  : facteur de croissance transformant  
beta  
TCR : récepteurs des lymphocytes T  
TME : microenvironnement tumoral  
TAMs : macrophages associés aux tumeurs  
TDM : Trehalose dimycolate  
T<sub>m</sub> : température de fusion

**V**

VDR : récepteur de vitamine D  
VDRES : éléments réponse à la vitamine D  
VEGF : facteur de croissance endothélial  
vasculaire  
VIH : virus de l'immunodéficience humaine

**U**

UVB : rayonne ultraviolet B

## Introduction

---

### Introduction

La tuberculose (TB), provoqué par *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), représente toujours un défi majeur de santé publique à l'échelle mondiale, il s'agit d'une maladie qui se caractérise par une interaction complexe entre le pathogène et le système de l'hôte (Ostrik et al., 2021). Au cœur de cette interaction, les macrophages ainsi que d'autres cellules immunitaires, qu'elles soient innées ou adaptatives, veillent sur les tissus et anticipent un rôle crucial dans la reconnaissance et l'extermination des agents pathogènes (Cara et al., 2025). La plasticité fonctionnelle des macrophages leur confère le potentiel de s'acquérir des phénotypes pro-inflammatoires (M1) ou anti-inflammatoires (M2), dont ils ont besoin pour combattre l'infection et guérir les tissus, par exemple chez la tuberculose, l'agent pathogène peut se maintenir sous forme latente ou visible (Herb et al., 2024a). Dans le cas d'une infection, les macrophages produisent des substances pro-inflammatoires comme l'interleukine-6 (*IL6*), ainsi l'activation de facteurs de transcription fondamentales en particulier le facteur nucléaire kappa B (*NF-κB*) (Kerkis et al., 2024).

La vitamine D c'est un micronutriment indispensable, favorise le fonctionnement cellulaire optimal et la santé des os, tout en montrant des perspectives encourageantes dans la régulation du système immunitaire (Naik et al., 2023). La vitamine D exerce des effets immunorégulateurs cruciaux par son impact sur l'immunité innée et adaptative, ce qui va au-delà de son rôle fondamental dans le métabolisme du calcium (Alonso et al., 2023). Diverses études scientifiques montrent que la vitamine D affecte les réponses immunitaires par la modulation des cytokines et le contrôle de l'activité des macrophages, ce qui peut influencer la progression de la tuberculose.

L'idée de ce projet de fin d'études, c'est la création d'amorces visant les gènes *IL6* et *NFKB1* exprimés par les macrophages en réaction à *Mycobacterium tuberculosis*, afin d'étudier l'effet potentielle de la vitamine D sur leur expression au cours de l'infection par *M. tuberculosis*. Comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de ces gènes et l'impact de la vitamine D pourrait ouvrir de nouvelles perspectives pour le développement de stratégies thérapeutiques adjuvantes dans la lutte contre la tuberculose.

### Chapitre 1. Revue de la littérature

#### 1.1. Calciférol

##### 1.1.1. Historique

La vitamine D, avec une histoire qui s'étend sur plusieurs siècles, est essentielle pour le métabolisme phosphocalcique et la santé osseuse. C'est Elmer McCollum, un biochimiste originaire des États-Unis, qui a attribué la dénomination vitamine D. Il a prouvé au début des années 1920 que l'administration d'huile de foie et l'exposition au soleil pouvaient prévenir le rachitisme (Schlienger & Monnier, 2019).

L'histoire de sa découverte et de son évolution peut être divisée en plusieurs phases cruciales :

- **Découvertes initiales :**

- **1824** : Le Dr. Schütte, un médecin allemand, a mis au jour les thérapies curatives à base d'huile de foie de morue pour le rachitisme, une pathologie osseuse affectant les enfants (Norman et al., 2012a).

- **1865** : le médecin Armand Trousseau recommande dans son traité de médecine clinique la consommation d'huile de foie de morue pour ses antirachitiques. Trousseau est également reconnu comme l'un des pionniers, après le Sniadecki russe, à avoir découvert que l'exposition au soleil pouvait prévenir le rachitisme chez les enfants.

##### **Identification des facteurs antirachitiques :**

- **1890** : Selon le docteur anglais Palm, dans le cadre d'une étude épidémiologique, la seule cause possible pour le rachitisme serait la carence d'exposition au soleil (Jones et al., 2022).

- McCollum a démontré en 1922 que l'huile de foie de morue maintenait ses propriétés antirachitiques, même après la destruction complète de sa vitamine A. Il identifie donc un autre élément liposoluble, qu'il nomme « vitamine D » et non « vitamine depositrice de calcium » (Jones et al., 2018).

- 1924 : Le docteur Harry Steenbock et le docteur Hess révèlent que l'exposition aux rayons ultraviolets peut entraîner la production d'un élément antirachitique dans les aliments et chez les animaux (Jarrett & Scragg, 2017).

- Vers la fin des années 20 : il a été clairement démontré que le rachitisme peut être évité et soigné grâce à une exposition directe au soleil, l'irradiation aux ultraviolets, la consommation d'aliments irradiés ou l'huile de foie de morue.

- **1932** : On procède à l'isolement de cristaux de vitamine D<sub>2</sub> pure (DeLuca et al., 2014).

## Chapitre 1. Revue de la littérature

---

- **1936** : les cristaux de vitamine D3 pure sont isolés à partir d'huile de foie de thon (Mohr et al., 2009).
- **1952** : le docteur Woodward réalise la première synthèse de vitamine D3 ce qui lui vaut le prix Nobel de chimie en 1965.
- **1964** : Norman a exposé la structure du calcitriol en 1971, à la suite de l'identification de trois métabolites de la vitamine D (Norman, 2012b).
- Depuis 1980, on a découvert la présence de récepteurs pour les dérivés de la vitamine D dans les cellules de divers organes (Schlienger & Monnier, 2019).

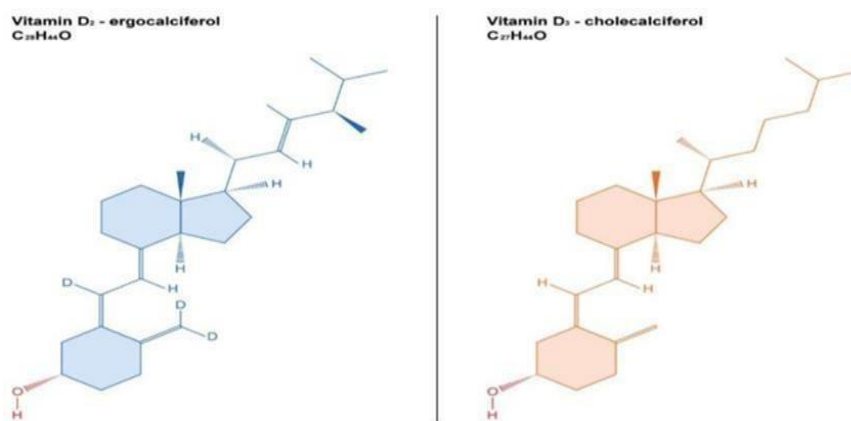
### 1.1.2. Définition

La vitamine D, aussi appelée calciférol ou cholécalciférol, est une hormone stéroïdienne liposoluble vitale à notre organisme. Elle participe à l'homéostasie phosphocalcique, à la santé des os et même au fonctionnement optimal du système immunitaire. Elle est synthétisée dans la peau sous l'action des rayons ultraviolet B (UVB) du soleil ou apportée par l'alimentation (Pop et al., 2022a).

### 1.1.3. Origine de calciférol

La vitamine D est présente sous deux formes (**figure1.1**) :

- ✓ La vitamine D2, ou ergocalciférol, qui est produit essentiellement par les végétaux et les champignons. Sous l'influence des UVB solaires, l'ergostérol en assure la synthèse (Combs & McClung, 2022).
- ✓ La vitamine D3, ou cholécalciférol, possède une double origine : endogène et exogène. L'origine endogène de la vitamine D3 est obtenue sous l'effet des rayonnements UVB qui permettent sa synthèse dans l'épiderme à partir du 7-déhydrocholestérol. En revanche, son origine exogène est obtenue à partir des sources alimentaires animales (Landrier et al., 2014).



**Figure 1.1. Différences structurales entre la vitamine D2 et la vitamine D3 (Pop et al., 2022a)**, vitamine D2 (ergocalciferol, C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O), et de la vitamine D3 (cholecalciferol, C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>O). La différence structurale entre la vitamine D2 et la vitamine D3 est présente dans leurs chaînes latérales. La vitamine D3 possède une chaîne latérale avec un anneau interrompu, alors que la vitamine D2 contient une double liaison entre les carbones 22 et 23 ainsi qu'un groupe méthyle positionné à la place 24 dans sa structure cyclique.

### 1.1.4. Sources de calciférol

Environ 90 % de la vitamine D est produite par la peau à la suite d'une exposition solaire quotidienne de 15 à 30 minutes par jour (Zajac et al., 2020). Le reste de la vitamine D provient de notre alimentation, principalement des huiles de poisson, des poissons (gras), du beurre, des œufs, des foies d'animaux et du lait (Mandlik et al., 2023).

**Tableau 1.1** : principales sources alimentaires de la vitamine D3 (Landrier et al., 2014).

Aliments	Vitamine D3 (µg/100g)	Vitamine D3 (UI/100g)
Huile de foie de morue	250	10 000
Saumon, hareng, anchois	12-20	480-800
Sardine, maquereau	8-12	320-480
Ton	4-7	160-280
Foie de veau	2-3	80-120
Jaune d'œuf	2-3	80-120
Lait	1,25	50
Beurre	0,6-1,5	24-60

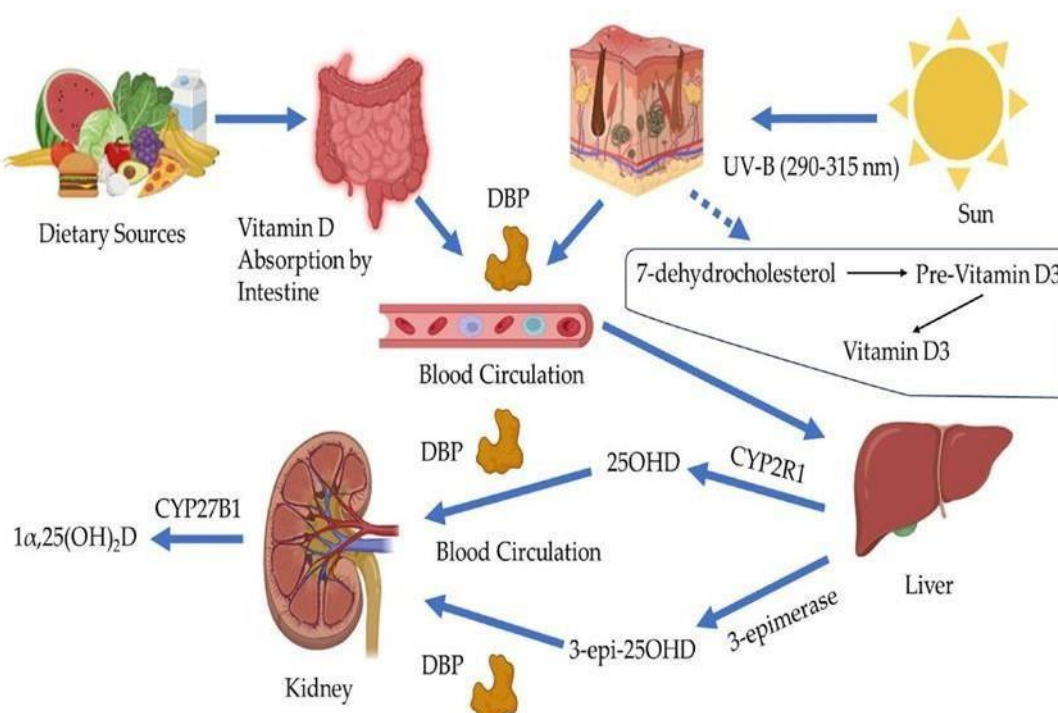
### 1.1.5. Processus biochimiques

Les UVB solaires jouent un rôle crucial en initiant la transformation du 7-déhydrocholestérol en prévitamine D3. Par la suite, la chaleur corporelle induit une isomérisation, qui convertit la prévitamine en sa forme active, la vitamine D3 (Pop et al. 2022). Par ailleurs, l'intestin absorbe la vitamine D provenant de l'alimentation. Après sa liaison à une protéine de transport, nommée DBP (Protéine de Liaison à la Vitamine D), que l'on trouve dans la peau ou l'intestin, la vitamine D est ensuite acheminée par le sang jusqu'au foie.

## Chapitre 1. Revue de la littérature

La vitamine D est d'abord soumise à une hydrolyse initiale au niveau du foie, ce qui la transforme en calcidiol, également connu sous le nom de 25-hydroxyvitamine D (25(OH)D). L'enzyme 25-hydroxylase (CYP2R1) catalyse cette réaction. La Figure 1.2 illustre la faculté de la 3-épimérase à transformer la 25(OH)D en 3-épi-25(OH)D. Par la suite, le 25(OH)D et son épimère s'attachent à la protéine de liaison de la vitamine D (DBP) pour leur acheminement vers les reins. La production de la vitamine D active ( $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ ) est assurée à ce stade par l'enzyme CYP27B1 (Alzohily et al., 2024).

Quand elle est active sur le plan métabolique, la vitamine D assume diverses fonctions dans le corps, comme contrôler les niveaux sériques de calcium et de phosphate, administrer le métabolisme des os et moduler le système immunitaire (Bui et al., 2021).



**Figure 1.2. Métabolisme de la vitamine D3 (Alzohily et al., 2024).** DBP : une protéine qui se lie à la vitamine D ; CYP2R1 : correspond au cytochrome P450 2R1, une enzyme considérée comme la principale hydroxylase de la vitamine D.

### 1.1.6. Récepteur de la vitamine D

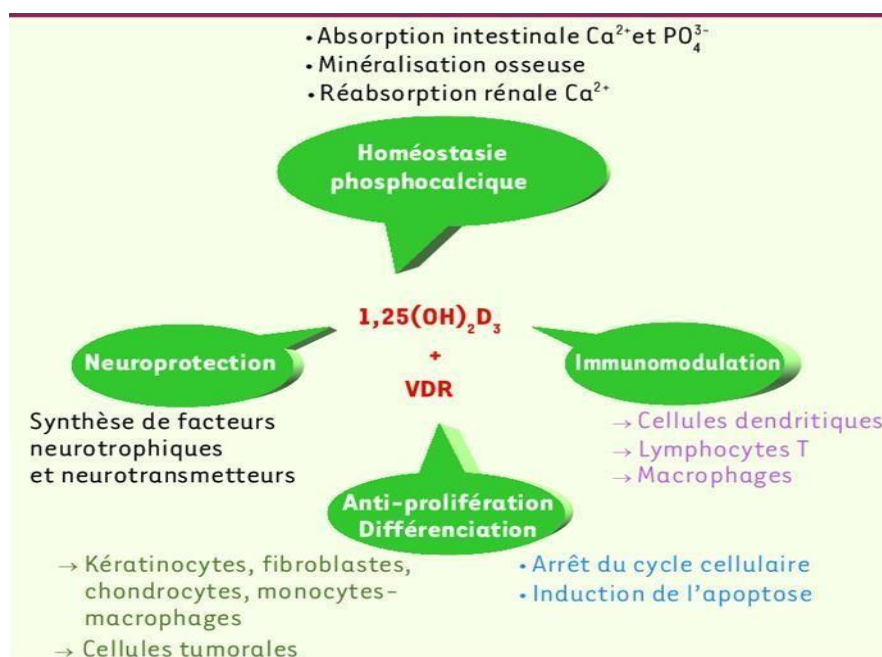
Le récepteur de la vitamine D (VDR) est un récepteur cytosolique extrêmement spécifique, qui fait partie de la superfamille des récepteurs nucléaires aux fonctions régulatrices dans la transcription.

Il joue un rôle crucial dans la transmission du signal du calcitriol ou du 1-alpha,25-dihydroxycalciférol ( $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ ).

## Chapitre 1. Revue de la littérature

Le VDR est présent dans la majorité des types cellulaires, ce qui fait qu'il est exprimé dans tous les tissus, signifiant que la plupart des cellules peuvent être ciblées du calcitriol (Fathi et al., 2019).

En présence de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ , le VDR est déclenché, ce qui conduit à la formation d'un hétérodimère avec le récepteur X des rétinoïdes (RXR). Le complexe  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ -VDR-RXR migre vers le noyau pour réguler la transcription des gènes impliqués dans les effets de la vitamine D (figure 1.3), notamment le métabolisme du phosphore et du calcium, la prolifération cellulaire et la régulation de l'immunité innée et adaptative (Usategui-Martín et al., 2022).



**Figure 1.3. Fonctions du VDR (Tissandié et al., 2006).** La vitamine D exerce ses effets biologiques par l'intermédiaire du récepteur de la vitamine D (VDR). Le  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  peut rapidement diffuser à travers les membranes cellulaires et se lier au VDR. Après s'être associé à son ligand, le récepteur de la vitamine D (VDR) crée des hétérodimères en se combinant avec le récepteur du rétinoïde X (RXR). Ce complexe se déplace ensuite vers le noyau cellulaire, où il s'attache aux éléments réactifs à la vitamine D (VDRE). Cette connexion facilite la régulation de la transcription des gènes. Le VDR contrôle également la transcription des gènes en interagissant avec d'autres récepteurs nucléaires. Parmi les rôles de la vitamine D figurent : la stimulation de la croissance et de la minéralisation osseuse, l'ajustement de la fonction immunitaire (la multiplication cellulaire la régulation de l'immunité innée et adaptative, la maîtrise de la sécrétion d'insuline, la supervision de la multiplication cellulaire, l'activation de la différenciation cellulaire, l'induction de l'apoptose, le maintien du rapport phosphore-calcium ainsi que le contrôle du transport du calcium au sein des muscles.

### 1.1.7. Effets de calciférol

Le calcitriol, forme active de la vitamine D, est essentiel pour la physiologie du métabolisme osseux et phosphocalcique. Il régule également les niveaux de calcium et de phosphore dans le sang et l'équilibre homéostatique des os (figure 1.4). La vitamine D a une importance cruciale pour l'organisme, principalement grâce à la présence de son récepteur VDR dans divers tissus (comme illustre le Tableau 1.2). Elle contribue notamment à renforcer la force musculaire, à diminuer les inflammations et à favoriser l'absorption du calcium au niveau de

## Chapitre 1. Revue de la littérature

l'intestin grêle. Elle contribue également à maintenir une homéostasie phosphocalcique, un aspect crucial pour la formation, la composition, la croissance et la réparation des os (Shadouh et al., 2020).

**Tableau 1.2. Cellules immunitaires et non-immunitaires qui expriment le VDR.**

	Cellule	Référence
Cellule immunitaire	Monocyte/Macrophage	(Agliardi et al., 2023)
	Lymphocyte T (CD4+, CD8+, Treg, Th1, Th2, Th17)	(Taqaarort & Chadli, 2020)
	Lymphocyte B	
	Cellule NK (Natural Killer), les cellules lymphoïdes innées (ILC)	(Ghaseminejad-Raeini et al., 2023a)
	Mastocyte	(Fenercioglu, 2024)
	Cellule Dendritique	
Cellule non-immunitaire	Ostéoblaste	(Mori et al., 2020)
	Cellule du Pancréas (îlots de Langerhans)	(Y. Wang et al., 2012)
	Cellule du Tissu Adipeux (Adipocyte)	(Saponaro et al., 2020)
	Kératinocyte (cellule de la peau)	(Oda et al., 2018)
	Cellule Épithéliale (intestinale, rénale, etc.)	(Y. Wang et al., 2012)
	Cellule Endothéliale	(Kim et al., 2020)

### 1.1.7.1. Effets dans le métabolisme phosphocalcique

La vitamine D est un élément indispensable pour l'absorption du calcium au niveau de l'intestin. Elle intervient dans plusieurs processus physiologiques, incluant l'accroissement du taux de calcium sérique par l'assimilation rénale et intestinale du calcium, ainsi que par le transit

## Chapitre 1. Revue de la littérature

paracellulaire de ce minéral. Elle est nécessaire au bon fonctionnement des systèmes cardiovasculaire, musculo-squelettique, immunitaires et neurologique (Piroux et al., 2021).

Le métabolisme phosphocalcique est largement influencé par la forme active de la vitamine D, le calcitriol (1,25(OH)<sub>2</sub>D), qui y occupe un rôle déterminant. Cette hormone contrôle l'assimilation et l'équilibre du calcium et du phosphate, éléments indispensables à la solidité osseuse, ainsi qu'à de nombreux processus physiologiques (Bopape et al., 2023).

### 1.1.7.2. Effets dans la santé osseuse

La vitamine D joue un rôle crucial dans le maintien d'une croissance osseuse normale tout au long de la vie. Elle prévient le rachitisme chez les enfants, une maladie qui nuit à la croissance des os. De même, chez les adultes, une carence en vitamine D peut conduire à l'ostéomalacie, caractérisée par un ramollissement des os (Moridi et al., 2020).

De plus, chez les personnes âgées, le calcitriol contribue à réduire le risque d'ostéoporose ainsi que celui de fractures en maintenant la densité osseuse et en favorisant une bonne santé squelettique globale (Charoenngam et al., 2019).

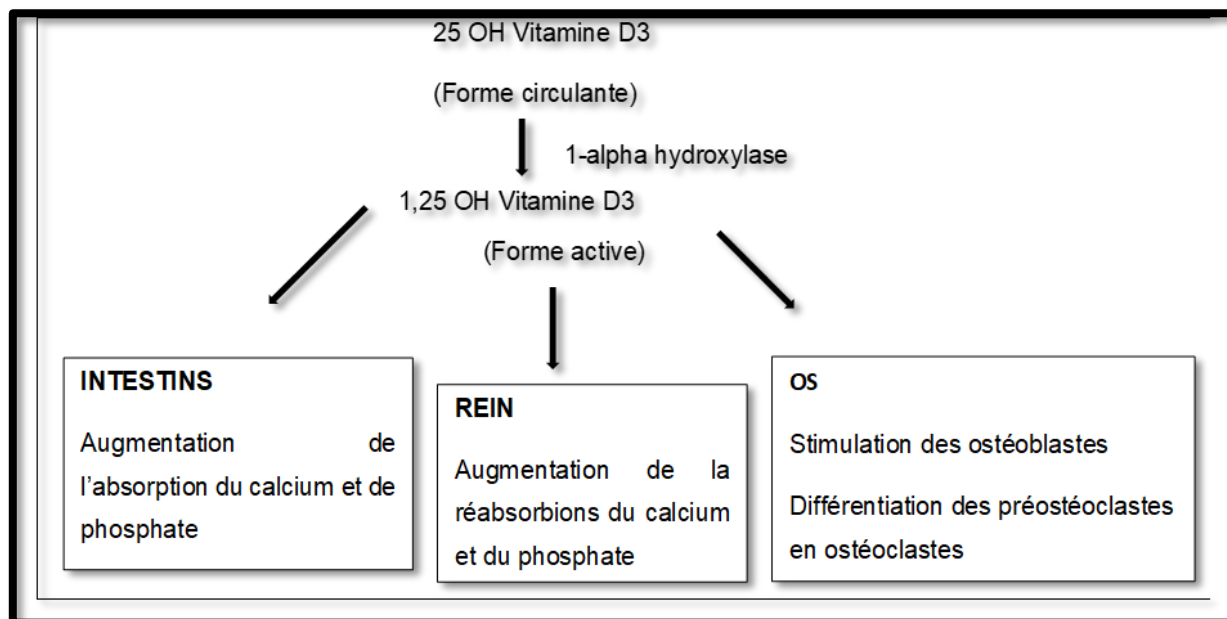


Figure 1.4. Actions du calcitriol (Amarine-Ferry, s. d.).

### 1.1.7.3. Calciférol et système immunitaire

Le système immunitaire est un ensemble complexe de diverses cellules, tissus, organes et substances qui composent le corps et qui sont chargés de lutter contre les infections et les maladies tout en préservant la tolérance envers soi-même. Plusieurs études suggèrent que le

## Chapitre 1. Revue de la littérature

---

calcitriol peut renforcer la réponse immunitaire innée, alors qu'il peut inhiber la réponse immunitaire adaptative (Asghari et al., 2022).

La présence de récepteurs de la vitamine D (VDR) dans les cellules immunitaires en multiplication, y compris les lymphocytes T, les lymphocytes B, les macrophages ainsi que les cellules présentatrices d'antigène, en interaction avec la capacité des cellules du système immunitaire à métaboliser la vitamine D, donnent à cette dernière un rôle d'immunomodulation (Voltan et al., 2023).

### 1.1.7.3.1. Calciférol et immunité innée

L'immunité innée constitue la première ligne de défense de l'organisme contre les infections. Elle repose sur des cellules capables de reconnaître et d'éliminer rapidement les agents pathogènes sans mémoire immunologique spécifique (figure 1.5) (Ghaseminejad-Raeini et al., 2023b).

- **Activation des monocytes et macrophages**

Les monocytes et les macrophages, qui sont des éléments clés de l'immunité innée, expriment une vaste gamme de récepteurs de reconnaissance de motifs (PRR, pour Pattern Recognition Receptor) (Gaidt et al., 2018). Parmi ces récepteurs, les récepteurs de type *toll* (TLRs, *toll-like receptor*), y compris TLR2 et TLR4, induisent l'expression de l'enzyme CYP27B1 qui convertit la vitamine D inactive (25(OH)D) en sa forme active [1,25(OH)<sub>2</sub>D]. Ces cellules, sous l'action de la vitamine D active, expriment le récepteur de la vitamine D (VDR) et renforcent leur aptitude à phagocyter et atténuer les agents infectieux (Dimitrov & White, 2017).

- **Production de peptides antimicrobiens**

La vitamine D joue un rôle établi dans l'accroissement de la biosynthèse de peptides antimicrobiens, par exemple les cathélicidines (LL-37) et les défensines. Ces peptides ont des caractéristiques antibactériennes, antivirales et antifongiques. Ils agissent en perturbant les membranes des micro-organismes et en stimulant l'autophagie. De plus, ces éléments sont susceptibles de participer à l'élimination des agents bactériens et au contrôle des processus inflammatoires (Charoenngam & Holick, 2020).

- **Modulation des cytokines pro-inflammatoires**

Alternativement, il est avancé que la vitamine D est impliquée dans la surexpression de cytokines pro-inflammatoires, notamment l'interleukine-6 (IL-6), l'interleukine-1 bêta (IL-1 $\beta$ ), et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ) (Fenercioglu et al., 2024). Par ailleurs, la vitamine D a un impact immunomodulateur remarquable, notamment en contrôlant la production de cytokines. Un des impacts les plus significatifs est la stimulation de la production de cytokines

## Chapitre 1. Revue de la littérature

---

anti-inflammatoires, en particulier l'IL-10. Elle inhibe la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-6, l'IL-1 $\beta$ , et l'IL-12, tout en limitant l'activation excessive des macrophages et des cellules dendritiques (Carlini et al., 2023). Elle contribue ainsi à prévenir les dommages tissulaires causés par une inflammation chronique ou excessive. La vitamine D, lorsqu'elle se connecte à son récepteur nucléaire (VDR), stimule la transcription de gènes associés à la tolérance immunitaire et encourage la différenciation des lymphocytes T régulateurs (Treg), qui sont les principales sources d'IL-10. Par ce mécanisme, la vitamine D favorise un profil immunitaire anti-inflammatoire, limitant les risques d'auto-immunité et de pathologies inflammatoires chroniques, telles que la sclérose en plaques, la polyarthrite rhumatoïde, cancer, ou les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Esterle et al., 2014). La vitamine D pourrait également influencer la façon dont notre système immunitaire réagit, notamment en modifiant les signaux d'activation sur certaines cellules immunitaires. Cela pourrait aider à diminuer les réponses inflammatoires excessives (comme les réponses Th1 et Th17), en favorisant plutôt des réactions plus calmes et tolérantes (Sparaco & Bonavita, 2024).

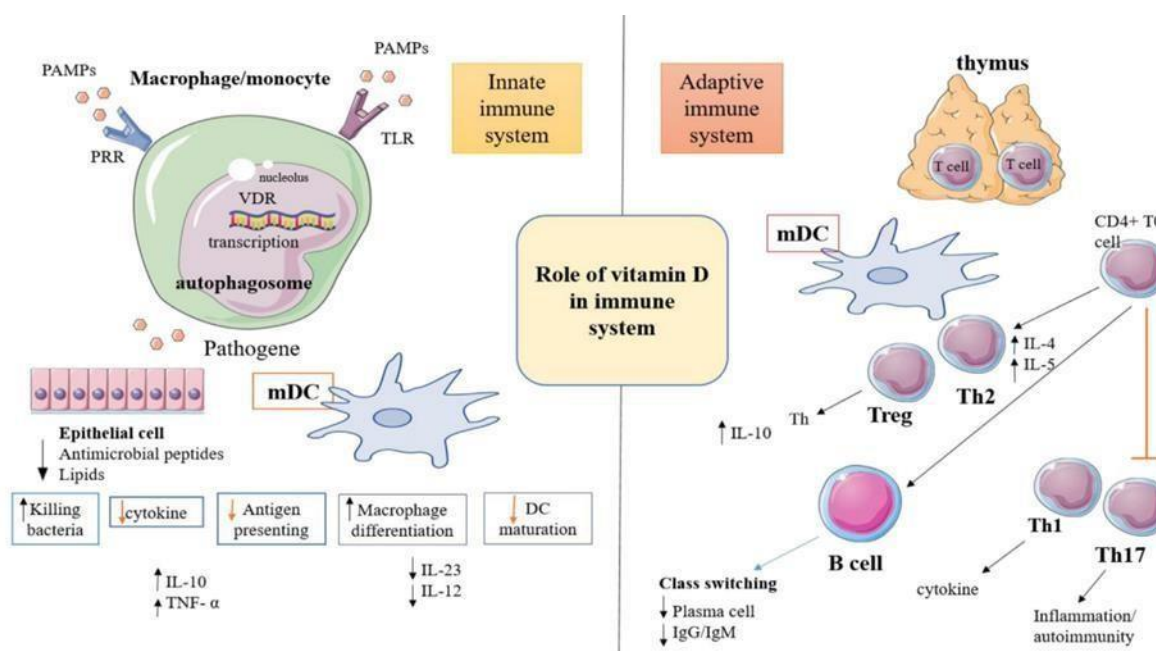
### 1.1.7.3.2. Effets de calciférol dans l'Immunité Adaptative

L'immunité adaptative constitue une réponse spécifique qui repose sur l'activation des lymphocytes T et B. Elle se caractérise par une mémoire immunitaire et une réponse plus ciblée aux agents infectieux (figure 1.5) (Guillot et al., 2011). Les lymphocytes T expriment également le VDR dont son activation par la vitamine D peut influencer leur différenciation. La vitamine D peut inhiber la différenciation des lymphocytes T de type 1 (Th1, T helper 1), qui produisent des cytokines pro-inflammatoires comme l'interféron-gamma (IFN- $\gamma$ ) et l'IL-2 impliquées dans les réponses inflammatoires excessives et les maladies auto-immunes (Athanassiou et al., 2023). De plus, la vitamine D peut réduire également la différenciation des lymphocytes Th17, qui produisent l'IL-17 impliquée dans l'inflammation chronique et les maladies auto-immunes, comme la sclérose en plaques et la polyarthrite rhumatoïde (L Bishop et al., 2020). La vitamine D a également la capacité de stimuler la génération de lymphocytes T régulateurs (Treg), comme le met en évidence la Figure 1.5. Ces cellules sont essentielles pour produire et libérer l'interleukine 10 (IL-10), une cytokine qui joue un rôle fondamental dans la suppression de l'inflammation. De ce fait, elles contribuent au maintien de la tolérance immunitaire et à la prévention des maladies auto-immunes (Umar et al., 2018).

La vitamine D inhibe la prolifération des lymphocytes B et la production des immunoglobulines comme IgG et IgM (figure 1.5). Elle réduit également l'activation des lymphocytes B mémoire, ce qui limite la suractivation immunitaire et diminue le risque de maladies auto-immunes.

## Chapitre 1. Revue de la littérature

Les fonctions des cellules dendritiques peuvent être également moduler à la suite d'une stimulation par la vitamine D. On a également observé l'impact de la vitamine D sur les cellules dendritiques du système immunitaire. Ces fonctions regroupent la présentation antigénique, la sécrétion des cytokines qui participent dans la différenciation des lymphocytes Th, l'induction de la tolérance immunitaire, la modification de la production de cytokines (Iruetagoiena et al., 2015).



**Figure 1.5. Effets de calciférol dans le système immunitaire (Asghari et al., 2022b).** Dans l'immunité innée la vitamine D agit sur les macrophages/monocytes et les cellules épithéliales en modulant la réponse aux pathogènes par la reconnaissance des motifs moléculaires (PAMPs) via les récepteurs PRR et TLR, entraînant la transcription de gènes et la formation d'autophagosomes. Elle favorise également la production de cytokines (IL-10, TNF-α), la présentation d'antigènes, la différenciation des macrophages et la maturation des cellules dendritiques (DC). En ce qui concerne l'immunité adaptative, la vitamine D module la différenciation des cellules T naïves (Th0) vers des phénotypes régulateurs (Treg) ou effecteurs (Th1, Th2, Th17), en agissant sur la production de cytokines et en régulant les réponses inflammatoires et auto-immunes. Elle participe aussi au changement de classe des lymphocytes B, stimulant la production d'anticorps (IgG, IgM). PAMPs : Pathogen-associated molecular pattern molecules ; PRR : Pattern recognition receptors ; IL-10 : Interleukine 10 ; TNF-α : Tumor necrosis factor alpha ; mDC : cellule dendritique ; IgG : Immunoglobuline G ; IgM : Immunoglobuline M.

### 1.2. Macrophage

#### 1.2.1. Généralité

Le terme macrophage découle de la fusion des radicaux grecs « macro- », qui signifie vaste, et « -phage », qui fait référence à la consommation ou à l'absorption. Elie Metchnikoff a d'abord mis en lumière ce concept en 1882, à la suite de ses études sur les larves d'étoiles de mer, puis sur la *Daphnia magna* (souvent nommée puce d'eau), qui était affectée par des spores fongiques. Il désigne ces cellules comme étant à l'origine de la phagocytose des substances étrangères. Pour cette avancée significative, il a reçu le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1908. Par conséquent, depuis plus de 130 ans, les macrophages sont reconnus comme les cellules immunitaires innées majeures (Chen et al., 2023a).

Les macrophages sont des acteurs clés du système immunitaire de l'organisme. Étant distribués dans la majorité des tissus majeurs, ils représentent la première ligne cellulaire de l'immunité innée. Bien que leur fonction la plus caractéristique est la phagocytose des agents pathogènes. En outre, ils peuvent participer à la présentation d'antigènes et la sécrétion de cytokines (Herb et al., 2024b). Les macrophages participent également aux réactions inflammatoires et auto-immunes, et initient la réponse immunitaire adaptative en présentant des antigènes aux lymphocytes T, permettant ainsi une réponse plus spécifique et ciblée (Yang et al., 2023).

Les macrophages appartiennent au système phagocytaire mononucléaire, une famille de cellules immunitaires qui comprend également les monocytes (précurseurs des macrophages) et les cellules dendritiques (impliquées dans la présentation des antigènes) (Strizova et al., 2023).

#### 1.2.2 Origine

En tant que cellules clés du système immunitaire, les macrophages jouent un rôle crucial dans la protection de l'organisme contre les agents infectieux et dans la préservation de l'homéostasie des tissus. Leur développement est un processus complexe qui commence dès la vie embryonnaire et se poursuit tout au long de la vie (Bajgar & Krejčová, 2023).

L'origine des macrophages tissulaires provient de trois principales sources :

- Le sac vitellin
- Le foie fœtal B
- Et la moelle osseuse

Les premiers macrophages apparaissent dans le sac vitellin au cours de l'hématopoïèse primitive, le processus de formation des cellules sanguines chez l'embryon. Ils sont la seule cellule immunitaire produite dans le sac vitellin et sont présents sous forme de macrophage

## Chapitre 1. Revue de la littérature

---

résidents dans certains tissus, où ils jouent un rôle important dans la formation et la conservation de ces tissus (Hoeffel & Ginhoux, 2015).

Plus tard, au cours du développement précoce, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) émergent dans le foie fœtal (Sreejit et al., 2020a), et donnent naissance à toutes les lignées de cellules immunitaires, y compris les macrophages (Figure 1.6). Dans la moelle osseuse, les monocytes proviennent des cellules progénitrices myéloïdes et circulent dans le sang pendant plusieurs jours avant de pénétrer dans les tissus et de se différencier en macrophage (Guirado et al., 2013).

La fonction et la morphologie des macrophage varient en fonction de leur localisation tissulaire et du microenvironnement local. Ils peuvent adopter différents noms et fonctions spécifiques (Tableau 1.3).

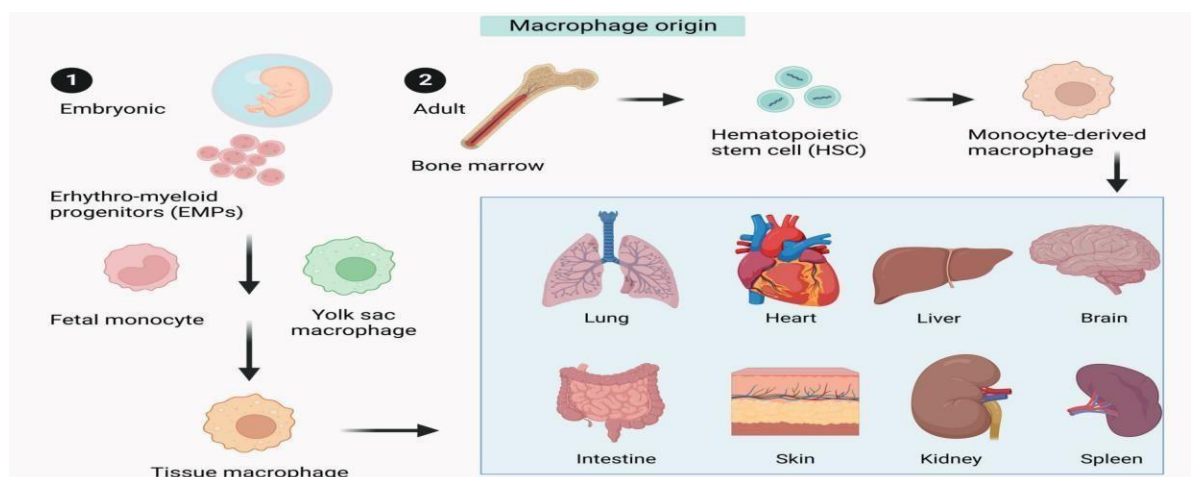
**Tableau 1.3.** Types de Macrophages et leurs Fonctions

Type de macrophage	Localisation	Fonctions principales	Références
<b>Microglies</b>	Système nerveux central	Surveillance immunitaire, phagocytose, Entretien du tissu nerveux, Élagage et remodelage synaptiques.	(Sreejit et al., 2020b)
<b>Cellules de Kupffer</b>	Foie	Filtration du sang, élimination des particules étrangères et cellules endommagées.	(Zhao et al., 2025)
<b>Macrophages alvéolaires</b>	Poumons	Phagocytose des particules inhalées et des agents pathogènes.	(Bissonnette et al., 2020)
<b>Ostéoclastes</b>	Os	Remodelage osseux, résorption du tissu osseux.	(Behzatoglu, 2021)
<b>Histiocytes</b>	Rate, tissu conjonctif	Présentation des antigènes aux lymphocytes, participation à la réponse immunitaire.	(Verma & Saraf, 2017)
<b>Cellules de Langerhans</b>	Peau	Surveillance immunitaire, présentation des antigènes.	(Botting et al., 2017)
<b>Macrophages intestinaux</b>	Intestin	Tolérance immunitaire ; Surveillance et phagocytose ; Protection contre les agents pathogènes.	(Bain & Mowat, 2014)

## Chapitre 1. Revue de la littérature

De plus ces modifications tissulaires, on observe la présence de diverses populations de macrophages :

- **Macrophages résidents** : présents dans les tissus en conditions normales, ils contribuent à l'homéostasie tissulaire et à la réparation des tissus, à l'élimination des cellules mortes et des débris, et à la régulation de l'inflammation.
- **Macrophages dérivés des monocytes** : constituent une population distincte de cellules immunitaires qui sont spécifiquement recrutées sur les sites d'inflammation ou d'infection. Ils participent à la défense de l'hôte en phagocytant les agents pathogènes et en produisant des cytokines pro-inflammatoires (Chen et al., 2023a).



**Figure 1.6. Capacités de transformation et propriétés fonctionnelles des macrophages** (Chen et al., 2023).

### 1.2.3. Profil phénotypique

Les macrophages sont des cellules clés du système immunitaire. Leur rôle est essentiel dans les mécanismes du système immunitaire, agissant comme des spécialistes en phagocytose. Ils sont connus pour leur hétérogénéité, c'est-à-dire qu'ils existent sous différentes formes ou populations de cellules. Cette diversité leur permet de remplir un large éventail de fonctions dans l'organisme (Wu & Lu, 2020).

Les macrophages se distinguent aussi par leur grande plasticité. Cela signifie qu'ils ont la capacité de modifier leurs profils fonctionnels et phénotypiques en réponse à différents stimuli. Ces stimuli peuvent être des signaux inflammatoires ou pathologiques, tels que des infections ou des lésions tissulaires, ainsi que diverses cytokines libérées par les cellules T helper (Th1 et Th2). Ils sont subdivisés en deux phénotypes (figure 1.7) suivant la terminologie lymphocytaire Th1 et Th2 : les macrophages classiquement activés (M1) et les macrophage alternativement activés (M2) (Chen et al., 2023a).

### 1.2.3.1. Macrophages classiquement activés

Les macrophages classiquement activés, également appelés macrophages M1, sont des acteurs clés de la réponse immunitaire et activés par des composants bactériens tels que le LPS et des cytokines pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ ) (Pérez & Rius-Pérez, 2022). Ces cellules participent dans la lutte contre les pathogènes intracellulaires, la destruction des tissus infectés et la résistance antitumorale. En présence d'infections bactériennes, les macrophages initient une réponse immunitaire robuste caractérisée par une amplification de l'expression génique de diverses molécules clés. Cette régulation inclut des gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 1 bêta (IL-1 $\beta$ ), l'interleukine 6 (IL-6), l'interleukine 12 (IL-12) et le facteur de nécrose tumorale (TNF). Par ailleurs, on observe également une augmentation de l'expression des récepteurs de cytokines, notamment IL-7R et IL-15RA. On note aussi une augmentation des chimiokines telles que le ligand 2 du motif CC (CCL2), le ligand 5 du motif CC (CCL5) et le ligand 8 du motif CXC (CXCL8), ainsi que du récepteur de chimiokine CCR7 (CCR type 7) (He & Carter, 2015; Shapouri-Moghaddam et al., 2018). Les macrophages M1 se caractérisent aussi par l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité II (CMH-II), du marqueur CD68, des molécules de costimulation CD80/CD86, et par la production de monoxyde d'azote (NO) grâce à l'iNOS (Ni et al., 2023).

L'activation des macrophages pro-inflammatoires déclenche une cascade de réponses cellulaires, incluant la régulation de l'expression de protéines qui modulent la signalisation des cytokines. Parmi ces régulateurs intracellulaires, le suppresseur de la signalisation des cytokines 3 (SOCS3) (Ahmad et al., 2022a).

### 1.2.3.2. Macrophage alternativement activé

Les macrophages M2 se distinguent par leur production de cytokines anti-inflammatoires, notamment l'IL-10 et le TGF- $\beta$ , ainsi que de chimiokines telles que CCL1, CCL13, CCL18, CCL22 et CCL24. Ces molécules jouent un rôle essentiel dans le recrutement de diverses cellules immunitaires, incluant les lymphocytes T régulateurs (LT reg), les lymphocytes B, les basophiles et les éosinophiles (Tabas & Bornfeldt, 2016).

Les macrophages M2, résultant d'une activation par l'IL-4 et l'IL-13, jouent un rôle dans la réponse antiparasitaire, la réparation tissulaire, l'allergie et le développement tumoral. Dans les tissus et les muqueuses humains, il existe plusieurs sous-ensembles de macrophages M2 (**figure 1.7**) qui ont été identifiés en fonction de leurs fonctions spécifiques et de l'expression de leurs marqueurs de surface (Shapouri-Moghaddam et al., 2018).

Les cytokines IL-4 et IL-13 induisent les macrophages M2a, qui contribuent à la régénération tissulaire et au processus de cicatrisation. Leur forte expression du récepteur du mannose

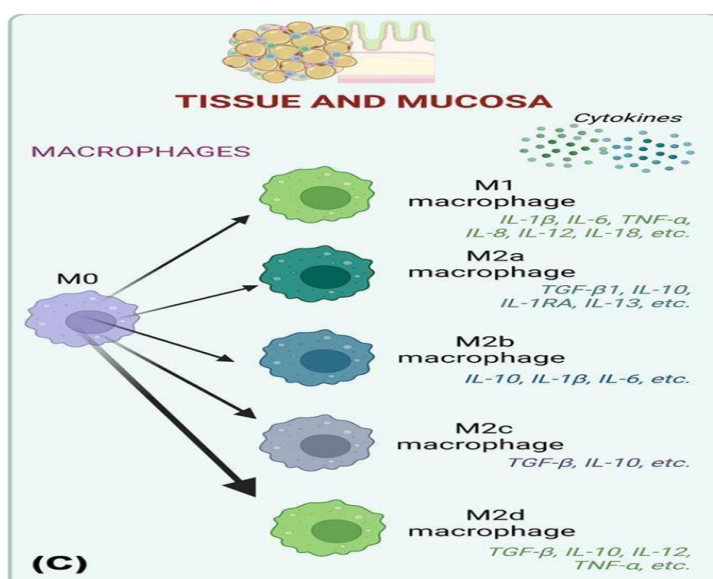
## Chapitre 1. Revue de la littérature

(CD206) leur permet de phagocyter efficacement les cellules et débris apoptotiques, contribuant ainsi aux mécanismes de guérison. Les M2a activés montrent une expression croissante de l'IL-10, du TGF- $\beta$ , ainsi que des ligands de chimiokines CCL17, CCL18 et CCL22 (Pérez & Rius-Pérez, 2022).

Les macrophages M2b sont induits par les complexes immuns et les agonistes des récepteurs TLR, notamment le LPS. Ils se caractérisent par une forte production de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10, IL-6, IL-1 et la chimiokine CCL1. En outre, les macrophages M2b exprimant des niveaux élevés de CD86 peuvent aussi être impliqués dans la présentation de l'antigène (Hourani et al., 2022).

Les macrophages M2c, induits par l'IL-10 et les glucocorticoïdes, interviennent dans les phases finales des réponses immunitaires et la résolution de l'inflammation. Ils se caractérisent par une forte expression du récepteur CD163, qui joue un rôle dans l'élimination des complexes haptoglobine/hémoglobine et présentent une transcription accrue de l'IL-10, du TGF- $\beta$ , du CCL16 et du CCL18 (L. Deng et al., 2023).

Finalement, les macrophages M2d se différencient sous l'activation des récepteurs de l'adénosine, modulant la signalisation par IL-4R $\alpha$ . Ils jouent un rôle non seulement dans la régénération des tissus, mais aussi dans l'invasion des cellules cancéreuses *in vitro* (Strizova et al., 2023).



**Figure 1.7. Phénotypes et polarisation de macrophage** (Strizova et al., 2023). Dans les tissus et les muqueuses humaines, les macrophages M0 sont polarisés vers les phénotypes chacun caractérisé par des profils de cytokines uniques et présentant des fonctions spécialisées qui sont cruciales pour le déroulement normal des processus physiologiques et pathologiques du corps. M1, stimulé par l'interféron-gamma (IFN- $\gamma$ ) ou les lipopolysaccharides (LPS), produit des cytokines telles qu'IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-12 et IL-18. D'autre part, M2a sont stimulées par l'IL-4 ou l'IL-13., en sécrétant des cytokines comme TGF- $\beta$ 1, IL-10, IL-1RA et IL-13, M2b sécrètent des cytokines pro- et anti-inflammatoires telles qu'IL-10, L'IL-1 $\beta$  et l'IL-6, M2c, stimulée par les glucocorticoïdes ou l'IL-10, encourage la génération de TGF- $\beta$  et IL-10, tandis que le M2d libère des cytokines comme le TGF- $\beta$ , IL-10, IL-12 et TNF- $\alpha$ .

### 1.2.4. Fonctions des macrophages dans l'auto-immunité, immunité antitumorale et anti-infectieuse

Les macrophages ont des fonctions multidimensionnelles dans l'auto-immunité, l'immunité contre la tumeur et l'immunité anti-infectieuse, servant de médiateurs indispensables dans ces mécanismes. Leur capacité à s'adapter à divers signaux environnementaux leur permet de passer d'un état pro-inflammatoire à un état anti-inflammatoire, influençant ainsi l'évolution de la maladie (Funes et al., 2018).

#### 1.2.4.1 Fonctions dans l'auto-immunité

- **Présentation des autoantigènes**

La présentation des antigènes constitue un mécanisme clé du système immunitaire, assurant la transition entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Agissant en tant que cellules présentatrices d'antigènes (CPA), les macrophages jouent un rôle crucial dans la captation, le traitement et l'exposition des antigènes aux lymphocytes T. Ils influencent l'activation, la tolérance et la régulation des réponses immunitaires par leurs interactions avec les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et les lymphocytes T cytotoxiques CD8<sup>+</sup>. Ce double rôle, à la fois dans le déclenchement des réponses immunitaires et dans le maintien de l'équilibre immunitaire, illustre leur importance aussi bien en situation normale qu'en contexte pathologique (Brancewicz et al., 2025).

- **Réponse inflammatoire**

En plus de leur rôle bien établi dans la présentation des antigènes aux lymphocytes T, les macrophages exercent une fonction cruciale dans la modulation des réponses immunitaires. Ils jouent le rôle de véritables chefs d'orchestre, maintenant un équilibre fragile entre la stimulation immunitaire et la tolérance. Cette fonction régulatrice s'appuie sur la production de cytokines, l'expression de molécules immunomodulatrices et leurs interactions avec les lymphocytes Tregs (Bashir et al., 2016).

Les macrophages dits M1, à profil pro-inflammatoire, produisent des cytokines comme l'IL-12 et le TNF- $\alpha$ , qui stimulent les réponses de type Th1 et renforcent l'inflammation. Cette polarisation est cruciale pour la lutte contre les infections intracellulaires et les cellules tumorales. Toutefois, une activation prolongée ou excessive de ces macrophages peut favoriser l'apparition de pathologies inflammatoires chroniques, comme la polyarthrite rhumatoïde ou les maladies inflammatoires de l'intestin (Chen et al., 2023b).

## Chapitre 1. Revue de la littérature

---

À l'opposé, les macrophages M2, à profil anti-inflammatoire, contribuent à la tolérance immunitaire et à la régénération tissulaire. Ils inhibent l'activité des lymphocytes T effecteurs et stimulent la multiplication des Tregs en sécrétant des cytokines telles que l'IL-10 et le TGF- $\beta$ . Ces mesures sont essentielles pour contenir les réactions immunitaires nuisibles et éviter l'émergence de troubles auto-immuns (Peng et al., 2023).

- **Homéostasie tissulaire**

Les macrophages jouent un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie des tissus, notamment grâce à leur aptitude à éliminer les cellules apoptotiques par un processus appelé efferocytose. Cette fonction est cruciale pour empêcher l'activation inappropriée du système immunitaire, et par conséquent, éviter l'émergence d'une auto-immunité (Arandjelovic & Ravichandran, 2015).

### 1.2.4.2 Fonctions dans l'immunité antitumorale

Les macrophages ont une fonction double et complexe dans l'immunité contre les tumeurs, possédant des rôles à la fois pro-tumoraux et antitumoraux, en fonction de leur phénotype et de l'environnement tumoral (Monnier et al., 2022).

Les macrophages, qui constituent des composants essentiels du microenvironnement tumoral (TME), démontrent une plasticité fonctionnelle notable en adoptant des phénotypes pro-inflammatoires (M1) ou anti-inflammatoires (M2) selon les signaux qu'ils reçoivent de leur environnement (Cendrowicz et al., 2021). Les macrophages M1, activés par des stimuli tels que l'IFN- $\gamma$  et le LPS, exercent des effets antitumoraux en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-12), en produisant des radicaux libres (NO, ROS) et en présentant des antigènes tumoraux aux lymphocytes T via les molécules du CMH II, favorisant ainsi l'activation des réponses immunitaires adaptatives (Toledo et al., 2024).

Un autre processus essentiel par lequel les macrophages M1 manifestent leurs effets contre le cancer est la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) (Pan et al., 2020). Dans l'ADCC, les macrophages de type M1, qui expriment des récepteurs Fc $\gamma$ , s'associent aux cellules cancéreuses recouvertes d'anticorps spécifiques à certains antigènes tumoraux. Cette liaison active le macrophage M1, qui libère alors des molécules cytotoxiques (comme celles mentionnées précédemment : ROS, NO, TNF- $\alpha$ , granzymes) directement sur la cellule tumorale, entraînant sa lyse. Ainsi, l'ADCC offre la possibilité d'attaquer précisément les cellules cancéreuses identifiées par les anticorps, tout en tirant parti de la force cytotoxique des macrophages M1 (Boyerinas et al., 2015). Certaines approches d'immunothérapie tirent parti de cette voie en recourant à des anticorps monoclonaux qui visent les cellules

## Chapitre 1. Revue de la littérature

---

cancéreuses et favorisent leur élimination par les cellules effectrices du système immunitaire, on retrouve parmi les cellules de ce type les macrophages M1 (Czajka-Francuz et al., 2023).

Par contre, les macrophages M2, stimulés par des cytokines telles que l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13, contribuent à l'avancement de la tumeur en stimulant l'angiogenèse, la défense immunitaire et la restructuration de la matrice extracellulaire (Basak et al., 2023).

Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) en sont un parfait exemple, car ils peuvent développer un phénotype M2 qui entrave la réaction immunitaire anti-tumorale grâce à la production de cytokines immunosuppressives (IL-10, TGF- $\beta$ ) et l'expression de ligands inhibiteurs tels que PD-L1, interagissant avec PD-1 sur les lymphocytes T (Zhang et al., 2023). En outre, le TGF- $\beta$  produit par les TAMs limite l'action des cellules T et NK, en particulier l'expression de molécules cytotoxiques comme l'IFN- $\gamma$  et la granzyme B (Pu & Ji, 2022).

Les macrophages peuvent également phagocyter les cellules tumorales, un processus amélioré par la présence d'anticorps ciblant les cellules tumorales ou par l'opsonisation. Cependant, l'expression de PD-1 sur les TAMs inhibe leur capacité de phagocytose, un effet qui peut être inversé par le blocage de l'axe PD-1/PD-L1, soulignant le rôle de ce point de contrôle immunitaire dans la régulation de la phagocytose macrophagique (Liu et al., 2023).

### 1.2.4.3. Fonctions dans l'immunité anti-infectieuse

Les macrophages jouent un rôle central dans l'immunité anti-infectieuse, agissant comme des cellules sentinelles capables de détecter, phagocyter et détruire les agents pathogènes (bactéries, virus, champignons, parasites), tout en coordonnant la réponse immunitaire (X.-L. Wang et al., 2024).

- **Reconnaissance des pathogènes**

Les macrophages contiennent des récepteurs de reconnaissance de motifs (PRR), incluant les récepteurs de type Toll (TLR), les récepteurs de type NOD (NLR) et les récepteurs à domaine unique C de type lectine (CLR), qui sont capables d'identifier les motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP), comme le LPS des bactéries, l'ARN viral ou les  $\beta$ -glucanes des champignons. Ils peuvent parallèlement servir de récepteurs opsonines, tels que les récepteurs Fc $\gamma$  (qui se lient aux anticorps IgG) et les récepteurs du complément CR1/CR3 (qui se fixent au complément C3b), facilitant ainsi la reconnaissance et la phagocytose des pathogènes opsonines (Almeida-da-Silva et al., 2023; Jayaraman et al., 2024).

- **Phagocytose et destruction des microbes**

À la suite de leur identification, les macrophages absorbent les agents pathogènes dans des phagosomes, lesquels se combinent avec des lysosomes pour donner naissance à des phagolysosomes.

L'élimination des microbes est effectuée grâce à la génération de radicaux libres (ROS, NO) via la NADPH oxydase et l'iNOS, ainsi que par le biais d'enzymes lysosomales (lysozyme, protéases, défensines) et l'acidification du phagolysosome (Bogdan et al., 2015).

- **Présentation de l'antigène et activation de l'immunité adaptative**

Les macrophages présentent des antigènes via le CMH : le CMH II pour l'activation des lymphocytes T CD4+ (réponse Th1/Th17) et le CMH I (cross-présentation) pour l'activation des lymphocytes T CD8+ (réponse cytotoxique). Ils sécrètent également des cytokines telles que l'IL-12, qui stimule les lymphocytes T et les cellules NK (réponse Th1/IFN- $\gamma$ ), et le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ , qui favorisent l'inflammation et le recrutement des neutrophiles (Blum et al., 2013).

- **Résolution de l'infection et réparation tissulaire**

Lors de la phase de guérison, les macrophages prennent un phénotype anti-inflammatoire (M2). Ils sécrètent des cytokines telles que le TGF- $\beta$  et l'IL-10 dans le but de réduire l'inflammation. De plus, ils contribuent à la cicatrisation en produisant des facteurs de croissance tels que le VEGF et le PDGF (Apeku et al., 2024).

### 1.3. *Mycobacterium tuberculosis*

#### 1.3.1. Définition

La tuberculose, maladie infectieuse qui demeure un enjeu de santé publique à l'échelle mondiale, a une histoire étroitement liée à celle de l'humanité. Identifiée depuis l'époque antique, des attestations de sa présence remontent à plusieurs milliers d'années. Décrite sous le nom de "phtisie" par Hippocrate (Dupont et al., 2020), elle n'a été attribuée à *Mycobacterium tuberculosis* qu'en 1882, grâce aux travaux du médecin allemand Robert Koch, qui reconnaît désormais l'agent infectieux sous le nom de bacille de Koch (Cambau & Drancourt, 2014).

*Mycobacterium tuberculosis* (*M. Tuberculosis*), également connu sous le nom de bacille de Koch (BK), est l'agent causal de la tuberculose humaine et est considéré comme l'un des agents pathogènes humains les plus adaptables et persistants chez l'être humain (Yan et al., 2022). *M. tuberculosis* est une bactérie Gram positive qui appartient au groupe des bactéries résistantes aux acides. Cette bactérie possède plusieurs facteurs de virulence qui lui permet à échapper aux barrières muqueuses. L'infection causée par cet agent résulte de son interaction complexe avec le système immunitaire de l'hôte (Mohammadnabi et al., 2024).

#### 1.3.2. Taxonomie

*Mycobacterium tuberculosis* se classe parmi les Actinomycètes, au sein de l'ordre Actinomycétales, appartient à la famille Mycobacteriaceae et correspond au genre *Mycobacterium* (Gordon & Parish, 2018).

Voici la classification de la bactérie *M. tuberculosis*:

- **Règne** : Bactéries.
- **Embranchement** : Actinobacteria.
- **Classe** : Actinomycètes.
- **Ordre** : Actinomycétales.
- **Famille** : Mycobacteriaceae.
- **Genre** : *Mycobacterium*.
- **Espèce** : *Mycobacterium tuberculosis* (Gordon & Parish, 2018).

#### 1.3.3. Caractéristiques morphologiques et biochimiques

*M. Tuberculosis* est un bacille (bâtonnet allongé) qui mesure environ 1 à 4 µm de longueur et 0,3 de 0,6 µm de largeur (Fitriana et al., 2024). Cette bactérie possède une paroi cellulaire unique riche en lipides (acides mycoliques) ce qui lui rend très résistante face aux unes résistances aux colorants classiques, aux détergents et aux antibiotiques (Delogu et al., 2013). En raison de cette paroi lipidique, elle apparaît faiblement Gram-positive et est mieux

## Chapitre 1. Revue de la littérature

---

visualisée par des colorations spécifiques comme la coloration de Ziehl-Neelsen (Nair et al., 2023). Il s'agit d'une bactérie non sporulante, sans mobilité et sans capsule.

*M. tuberculosis* est une bactérie strictement aérobie (Fitriana et al., 2024). Elle nécessite de l'oxygène pour sa survie, ce qui explique sa prédilection pour les tissus pulmonaires riches en oxygène (Ufimtseva et al., 2021).

### 1.3.5. Pathogénicité

La tuberculose est une affection infectieuse principalement due à *M. tuberculosis*, une bactérie à développement lent et l'agent étiologique prédominant de la tuberculose pulmonaire. Cette forme de tuberculose est la plus courante, représentant environ 70 % des cas mondiaux de la maladie. La tuberculose pulmonaire affecte principalement les poumons et se caractérise par un ensemble de symptômes distincts. Les manifestations cliniques courantes incluent une toux chronique, souvent persistante et pouvant s'accompagner d'expectorations. D'autres signes fréquents sont la fièvre, une perte de poids inexplicée et des transpirations nocturnes abondantes (Chahboune et al., 2022). La tuberculose extra-pulmonaire se dissémine dans d'autres régions du corps, en dehors des poumons. Elle peut toucher différents organes tels que les reins, les os, le cerveau, les ganglions lymphatiques, les articulations, et même l'appareil génital (Natarajan et al., 2020). La transmission se fait essentiellement par voie aérienne, par inhalation de gouttelettes respiratoires émises par une personne infectée lors de la toux, des éternuements ou même en parlant (Misombo-Kalabela et al., 2016).

La porte d'entrée de l'infection est constituée par les voies respiratoires, où la bactérie atteint les alvéoles pulmonaires. Elle y est phagocytée par les macrophages, mais peut survivre et se multiplier à l'intérieur de ces cellules. La capacité de *M. tuberculosis* à créer une infection primaire, qui peut demeurer latente pendant plusieurs années, est la source de son pouvoir pathogène (Maertzdorf et al., 2018).

La réponse immunitaire de l'organisme se caractérise par la formation de granulomes, des structures organisées composées de macrophages, de lymphocytes et d'autres cellules immunitaires, visant à contenir la bactérie. Toutefois, la persistance de *M. tuberculosis* à l'intérieur de ces granulomes peut conduire à une réactivation de l'infection latente en cas de faiblesse du système immunitaire (Pai et al., 2016).

### 1.3.6. Cycle de l'infection

#### 1.3.6.1. Initiation de l'infection

L'infection par *Mycobacterium tuberculosis* suit un processus en plusieurs étapes bien définies :

## Chapitre 1. Revue de la littérature

---

- Elle commence lorsque la bactérie est inhalée sous forme de gouttelettes émises par une personne atteinte de tuberculose pulmonaire active. Ces gouttelettes atteignent les alvéoles pulmonaires, où se produisent les échanges gazeux (Ryndak & Laal, 2019).
- Une fois dans les alvéoles, les bacilles interagissent avec les macrophages alvéolaires, qui les phagocytent. Toutefois, *M. tuberculosis* a la faculté de perdurer au sein de ces cellules, ce qui déclenche l'infection (Sia et al., 2015).
- Les macrophages présentent ensuite des antigènes bactériens aux cellules dendritiques, qui migrent vers les ganglions lymphatiques. Ici, elles stimulent les lymphocytes T et B (Figure 1.8), déclenchant une réaction immunitaire adaptative vitale pour maîtriser l'infection ou restreindre sa diffusion (Wolf et al., 2007).

### 1.3.6.2. Infection latente

Cette phase comprend :

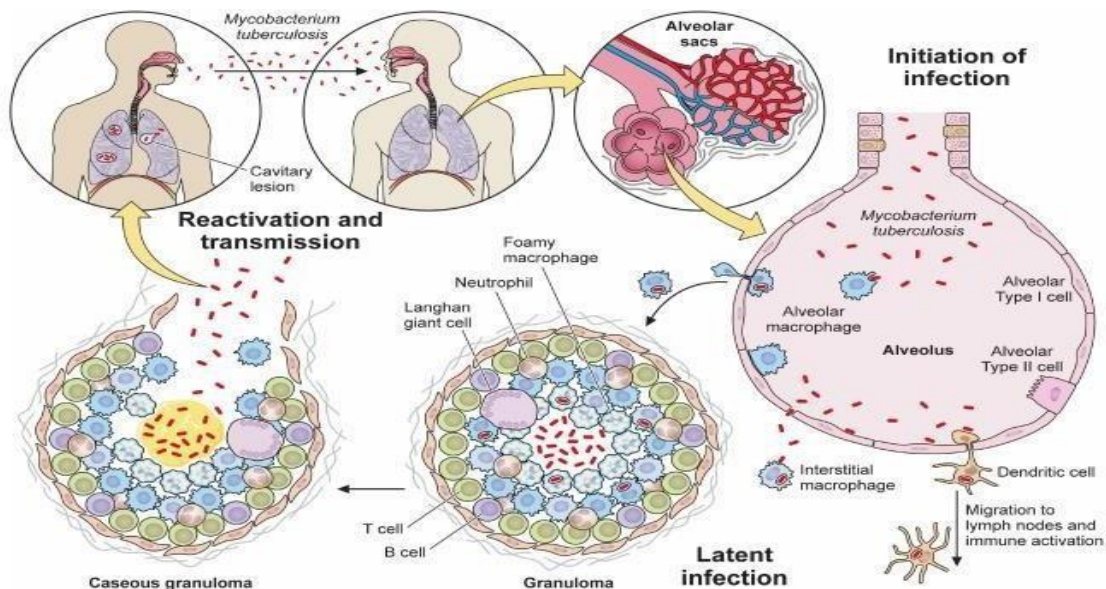
- Formation de granulomes : la formation de granulomes est une réponse immunitaire clé dans la tuberculose, impliquant l'interaction entre les macrophages et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, médiée par des cytokines telles que le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$ , convergent vers le site de l'infection dans les poumons, formant des structures appelées granulomes (Cronan et al., 2022).
- Contrôle de l'infection : dans la plupart des cas, le système immunitaire parvient à contenir l'infection à l'intérieur des granulomes. Les bactéries restent vivantes mais inactives, ce qui correspond à l'infection tuberculeuse latente (Kiazyk & Ball, 2017).
- Composition cellulaire des granulomes : Le granulome est composé de différents types de cellules immunitaires, notamment des macrophages (y compris des macrophages spumeux et des cellules géantes de Langhans) qui sont spécialisées dans la phagocytose prolongée. Ces cellules sont entourées de lymphocytes T et B, ainsi que de neutrophiles, qui participent à la régulation et au remodelage constant de l'environnement granulomateux. Cette diversité cellulaire reflète l'équilibre délicat entre la défense de l'hôte et la survie bactérienne (Ahmad et al., 2022b).

### 1.3.6.3. Réactivation et transmission

Cette phase se caractérise par :

- Affaiblissement du système immunitaire : si le système immunitaire s'affaiblit (par exemple, en raison du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), de la malnutrition ou la prise de certains médicaments), les bactéries peuvent se multiplier à nouveau.

- Tuberculose active : la réactivation de l'infection entraîne la destruction des tissus pulmonaires, formant des lésions cavitaires (trous) dans les poumons (Figure 1.8).
- Transmission de la bactérie : les personnes atteintes de tuberculose pulmonaire active peuvent propager la bactérie en toussant, en éternuant ou en parlant, libérant ainsi des gouttelettes infectieuses dans l'air (Rahlwes et al., 2023).



**Figure 1.8. Représentation schématique du cycle de vie de *M. tuberculosis* (Rahlwes et al., 2023).** *M. tuberculosis* pénètre dans l'organisme humain par les voies respiratoires où il engage le système immunitaire inné au niveau de l'espace alvéolaire. Les macrophages et les cellules dendritiques phagocytent les bactéries, mobilisent de nouvelles cellules et stimulent la réponse immunitaire adaptative. Ensemble, les systèmes immunitaires inné et adaptatif collaborent pour éradiquer la bactérie ou limiter sa réplication active au sein d'un granulome. La tuberculose active se manifeste soit à la suite d'une première infection, soit après une réactivation causée par un affaiblissement du système immunitaire, conduisant à une maladie symptomatique et à sa propagation vers un autre hôte, initiant ainsi un nouveau cycle d'infection.

### 1.3.7. Facteurs de virulence de *M. tuberculosis*

*M. tuberculosis* possède plusieurs facteurs de virulence qui lui permettent de survivre dans l'hôte, d'échapper au système immunitaire et de favoriser sa dissémination. Ces facteurs sont classés en facteurs non protéiques (lipides et polysaccharides) et facteurs protéiques (protéines sécrétées, enzymes, transporteurs, etc.) (Rahlwes et al., 2023).

#### 1.3.7.1. Facteurs de virulence non protéiques

Ces composants sont principalement des lipides et des polysaccharides qui jouent un rôle essentiel dans l'interaction entre la bactérie et l'hôte.

##### 1.3.7.1.1. Lipoarabinomannane

Le lipoarabinomannane (LAM) est une substance que l'on retrouve dans la paroi cellulaire de *M. tuberculosis*. Il inhibe l'activation des macrophages et diminue la production de cytokines pro-inflammatoires. Il peut également bloquer la fusion phagosome-lysosome et empêcher la

## Chapitre 1. Revue de la littérature

---

destruction de la bactérie. Enfin, il affecte la présentation des antigènes aux cellules T (Vergne et al., 2015).

### 1.3.7.1.2. Phthiocerol dimycocérosates

Les dimycocérosates de phthiocérol (PDIM) constituent un lipide de surface qui camoufle les caractéristiques immunogènes de la bactérie. Ce composant soutient la bactérie dans sa tentative d'échapper à la détection par les TLRs et contribue au contournement de la réaction immunitaire innée (Augenstreich et al., 2020).

### 1.3.7.1.3. Phosphatidyl-myo-inositol mannosides

Les mannosides de la phosphatidyl-myo-inositol (PIM) sont une classe des glycolipides qui se lient aux récepteurs macrophagiques (DC-SIGN, MR). Ces glycolipides favorisent l'invasion des cellules hôtes par la bactérie et régulent la réponse immunitaire en restreignant l'activation des macrophages (Ehlers et al., 2010).

### 1.3.7.1.4. Trehalose dimycolate

Trehalose dimycolate (TDM ou Cord factor) est un facteur responsable de la formation de granulomes dans les poumons. Il provoque une réponse inflammatoire exagérée, contribuant aux lésions pulmonaires et aide la bactérie à résister aux mécanismes de défense de l'hôte (T. K. T. Nguyen et al., 2020).

### 1.3.7.2. Facteurs de virulence protéiques

*Mycobacterium tuberculosis* a développé une gamme de facteurs de virulence protéiques qui lui permettent de survivre et de se répliquer dans les macrophages hôtes. Ces protéines interfèrent avec les processus cellulaires de l'hôte tels que la maturation des phagosomes, l'autophagie et les voies de mort cellulaire programmée (Wong et al., 2011).

- **Systèmes de sécrétion ESX et protéines associées**

*Mycobacterium tuberculosis* possède cinq systèmes de sécrétion de type VII (ESX-1 à ESX-5), ESX-1 étant particulièrement crucial pour la virulence. ESX-1 sécrète des protéines comme l'ESAT-6 (EsxA) et le CFP-10 (EsxB), qui perturbent les membranes phagosomales, facilitant l'évasion bactérienne dans le cytosol et modulant les réponses immunitaires de l'hôte (Augenstreich et al., 2017).

- **Inhibition de la fusion phagosome-lysosome**

*Mycobacterium tuberculosis* sécrète plusieurs protéines qui empêchent la maturation des phagosomes en phagolysosomes bactéricides :

## Chapitre 1. Revue de la littérature

---

- PtpA : Cette tyrosine phosphatase se lie à la sous-unité H de la vacuolaire-H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPae) de l'hôte et déphosphoryle VPS33B, perturbant l'acidification des phagosomes et la fusion avec les lysosomes. Il inhibe la maturation du phagosome par interaction avec de nombreuses protéines eucaryotes lors de la phagocytations de la mycobactérie (Kotliarova et al., 2025).
- SapM : Une phosphatase acide sécrétée qui déphosphoryle le phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P), un lipide essentiel à la maturation phagosomale, arrêtant ainsi le processus.
- PknG : Une sérine/thréonine kinase qui inhibe l'autophagie en bloquant la maturation des autophagosomes, empêchant ainsi la dégradation bactérienne (Puri et al., 2013).
- **Modulation des voies de mort des cellules hôtes**

*Mycobacterium tuberculosis* exploite différentes voies de mort cellulaire en sa faveur :

- Apoptose : *M. tuberculosis* inhibe l'apoptose pour maintenir sa niche intracellulaire. Le produit du gène *nuoG* interfère avec la production d'espèces réactives de l'oxygène, empêchant ainsi l'apoptose (Velmurugan et al., 2007).
- Nécroptose : La toxine nécrosante de la tuberculose (TNT) épuise les niveaux de NAD<sup>+</sup> de l'hôte, déclenchant la nécroptose via l'activation de RIPK3 et MLKL, conduisant à la mort cellulaire et à la dissémination bactérienne (Pajuelo et al., 2018).
- Autophagie : Au-delà de PknG, d'autres protéines M comme PE6 et ESAT-6 interfèrent également avec l'autophagie, entravant la capacité de l'hôte à dégrader les agents pathogènes intracellulaires (Ramon-Luing et al., 2023).

### 1.3.8. Réponse immunitaire innée contre *Mycobacterium tuberculosis* et rôle de la vitamine D

La tuberculose, causée par la bactérie *M. tuberculosis*, est marquée par une relation complexe avec le système immunitaire de l'homme. Cette interaction peut aboutir à trois issues principales :

- Le contrôle de l'infection par le système immunitaire.
- Le développement d'une tuberculose active.
- L'établissement d'une infection latente (H. Nguyen et al., 2020).

Les macrophages alvéolaires sont les premiers éléments du système immunitaire à entrer en contact avec le bacille de la tuberculose. En cas d'infection, les macrophages présents dans les poumons constituent le principal type de cellule qui capte la bactérie en premier lieu.

## Chapitre 1. Revue de la littérature

---

L'agent infectieux stimule les macrophages en se liant à différents récepteurs PRRs présents sur leur membrane, produisant de ce fait un effet antituberculeux. D'abord, les récepteurs de surface, comme le TLR2, le TLR4, le NOD2 et le Dectin-1, identifient les éléments du *M. tuberculosis*, tels que les glycolipides, le peptidoglycane et d'autres composants, ce qui entraîne la libération de plusieurs cytokines, telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-12, l'IL-6, l'IL-1 $\beta$ , etc... par les macrophages. Ces récepteurs agissent pour faciliter l'élimination des bactéries par les macrophages (Zhuang et al., 2024).

De nombreuses recherches ont démontré que le 1,25(OH) $_2$ D $_3$  régule les réactions immunitaires des macrophages pour la suppression précoce de *M. tuberculosis* grâce au récepteur VDR (El Baghdadi et al., 2013). Cette stimulation des macrophages entraîne une hausse de l'expression du récepteur à la vitamine D (VDR) et de la 1 $\alpha$ -hydroxylase (Fiske et al., 2019).

De plus, il a été rapporté que l'expression du VDR était régulée à la hausse par l'interaction des motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP) sur *M. tuberculosis* et du récepteur TLR2 sur les monocytes. Ces informations ont clairement souligné l'importance du 1,25(OH) $_2$ D $_3$  et du VDR dans le processus d'élimination de l'infection (J. Deng et al., 2021). Par la suite, le 1,25(OH) $_2$ D $_3$  agit sur le VDR, un récepteur nucléaire qui opère en tant que facteur de transcription. Ce complexe 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -VDR se couple à des séquences d'ADN spécifiques nommées éléments de réponse à la vitamine D (VDRE), entraînant l'expression de gènes qui codent pour des peptides antimicrobiens, notamment la cathélicidine et la défensine (J. Deng et al., 2021). Une fois synthétisée, la cathélicidine, est incorporée dans les phagosomes, où elle exerce une activité antibactérienne directe qui perturbe les membranes bactériennes. De plus, la défensine, un autre peptide antimicrobien, est également régulée par la vitamine D via un VDRE. Cependant, son expression nécessite une co-stimulation par le facteur nucléaire *NF- $\kappa$ B*. Il est également important de noter que l'IL-1, en se liant à son récepteur, IL-1R, active la voie *NF- $\kappa$ B*, ce qui potentialise la transcription de la défensine. Enfin, la cathélicidine et la défensine contribuent ensemble à la destruction intracellulaire de la bactérie dans les auto-lysosomes, résultant de la fusion des phagosomes avec les lysosomes (Lagishetty et al., 2011).

### 1.4. PCR

#### 1.4.1. Définition

Mise au point par Kary Mullis en 1983, la réaction en chaîne par polymérase (PCR) est devenue une méthode essentielle en biologie moléculaire (Vajpayee et al., 2023). Cette technique permet de dupliquer rapidement des séquences spécifiques d'ADN ou d'ARN, facilitant ainsi leur identification, le plus souvent par électrophorèse sur gel d'agarose (Wittmeier & Hummel, 2022).

La PCR est fréquemment employée pour amplifier, modifier et cloner des gènes dans le but d'examiner leur expression. Il existe de nombreuses autres applications de la PCR, notamment les tests de paternité, les relations biologiques, le génotypage des souris, le diagnostic des maladies génétiques, la médecine légale, et trouver des bactéries et des virus (Canene-Adams et al., 2013).

Cette technique *in vitro*, rapide, simple et peu coûteuse, est devenue un outil indispensable dans divers domaines de la recherche médicale et biologique. Son efficacité est démontrée dans de nombreux domaines :

- **Diagnostic des maladies infectieuses** : Elle permet la détection rapide d'agents pathogènes.
- **Génétique** : Elle facilite l'identification de variations et de mutations génétiques (Kalendar et al., 2017).
- **Oncologie** : Elle contribue au diagnostic et au suivi du cancer.
- **Médecine légale** : Elle est utilisée pour l'identification de personnes à partir d'échantillons d'ADN.
- **Étude de l'expression des gènes** : Elle permet d'analyser l'activité des gènes (Sancha Dominguez et al., 2024)

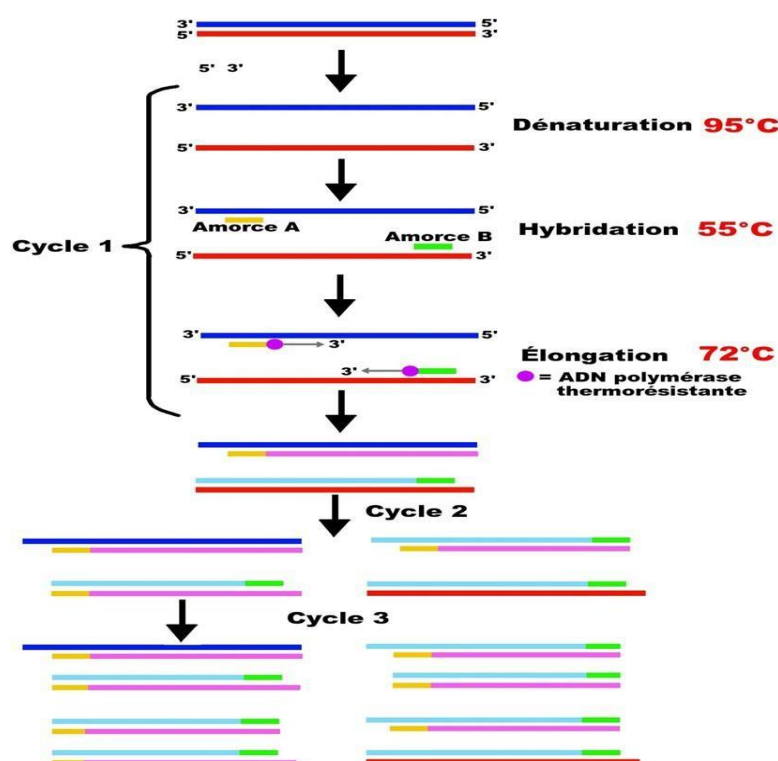
Depuis son invention, la PCR a été adaptée et modifiée pour répondre à des besoins spécifiques. Parmi les versions les plus essentielles, on retrouve la PCR en temps réel (qPCR), aussi connue sous le nom de PCR quantitative, qui offre la possibilité de quantifier l'ADN amplifié en temps réel, c'est-à-dire pendant la réaction. Contrairement à la PCR classique, qui ne fournit qu'une information qualitative (présence ou absence d'ADN), la qPCR permet de quantifier précisément la quantité d'ADN initialement présente dans l'échantillon. La PCR à transcription inverse (RT-PCR), permet d'amplifier l'ARN, une molécule qui joue un rôle crucial dans l'expression des gènes. L'ARN est initialement transformé en ADN complémentaire

## Chapitre 1. Revue de la littérature

(ADNc) grâce à une enzyme nommée transcriptase inverse, puis cet ADNc est amplifié via la PCR (Khehra et al., 2025a).

### 1.4.2. Principe de la PCR

La PCR est une technique puissante qui permet de multiplier de manière exponentielle une séquence d'ADN spécifique (Kee et al., 2023). En utilisant l'enzyme ADN polymérase, la PCR peut générer des milliards de copies d'un fragment d'ADN ciblé à partir d'un échantillon initial, qu'il s'agisse d'ADN génomique, d'ADN complémentaire (ADNc) obtenu par RT-PCR, ou d'ADN mitochondrial. La PCR se déroule en trois étapes majeures : la dénaturation de l'ADN, l'hybridation avec des amorces spécifiques à la séquence ciblée, et l'élongation de l'ADN par le biais de la polymérase (Figure 1.9). Chaque phase du processus de réaction en chaîne par polymérase (PCR) se divise en trois étapes spécifiques. La répétition de ces trois phases conduit à un doublement de la quantité d'ADN cible à chaque cycle (Garibyan & Avashia, 2013).



**Figure 1.9. Principe de la technique PCR (Sr et al., 2015).** À 94 °C, l'ADN est dénaturé, après quoi les amorces spécifiques se fixent sur les deux brins complémentaires de la séquence cible. La Taq polymérase peut alors se charger de l'élongation des amorces et de la copie du brin complémentaire à une température de 72 °C. Les morceaux d'ADN nouvellement créés fonctionnent comme modèle lors des cycles successifs, garantissant ainsi l'accroissement du fragment cible.

### 1.4.3. Composants de la PCR

#### 1.4.3.1. ADN Matrice (ADN Modèle)

L'échantillon d'ADN matrice représente celui qui renferme la séquence d'ADN que l'on souhaite amplifier. Il sert de modèle pour la conception de nouveaux segments d'ADN (Khehra et al., 2025b).

#### 1.4.3.2. ADN Polymérase

Un type d'enzyme qui produit de nouveaux brins d'ADN qui sont complémentaires à la séquence cible. L'ADN polymérase Taq (provenant de *Thermis aquaticus*) est la première et la plus répandue parmi ces enzymes, tandis que l'ADN polymérase Pfu (provenant de *Pyrococcus furiosus*) est prisée pour sa fidélité supérieure lors de l'amplification de l'ADN. Les polymérases employées en PCR sont obtenues à partir de bactéries qui vivent naturellement dans des conditions thermiques élevées, telles que celles trouvées dans les sources hydrothermales (Ishino & Ishino, 2014).

Bien que ces enzymes soient subtilement différentes, elles ont toutes deux capacités qui les rendent adaptées à la PCR :

- 1) Elles ont la capacité de produire de nouveaux segments d'ADN en se basant sur un modèle d'ADN et des amorces.
- 2) Elles sont résistantes à la chaleur (Din et al., 2020).

#### 1.4.3.3. Amorces

Ce sont de petits fragments d'ADN monocaténaire qui sont en correspondance avec la séquence cible. L'amorce sert de point de départ pour la synthèse d'un nouvel ADN par la polymérase (Apte & Daniel, 2009).

Voici une liste de critères à considérer lors de la création des amorces :

- La longueur de l'amorce doit être de 15 à 30 résidus nucléotidiques (bases) (Septiyanto et al., 2022).
- La teneur optimale en GC doit être comprise entre 40 et 60 % (Staff, 2019).
- L'extrémité 3' des amorces doit contenir un G ou un C afin de bloquer l'amorce et d'empêcher la « respiration » des extrémités, augmentant ainsi l'efficacité de l'amorçage. La « respiration » de l'ADN se produit lorsque les extrémités ne restent pas recuites mais s'effilochent où se séparent. Les trois liaisons hydrogène des paires GC contribue à inhiber la respiration tout en relevant aussi la température de fusion des amorces (Thornton & Basu, 2011).

## Chapitre 1. Revue de la littérature

---

- Les extrémités 3' d'un ensemble d'amorces, qui comprend une amorce à brin positif et une amorce à brin négatif, ne doivent pas être complémentaires l'une de l'autre, et l'extrémité 3' d'une seule amorce ne peut pas non plus être complémentaire d'autres séquences de l'amorce. Ces deux scénarios aboutissent respectivement à la formation de dimères d'amorces et de structures en boucle en épingle à cheveux.
- La température de fusion optimale ( $T_m$ ) des amorces se situent entre 52 et 58 °C, bien que la plage puisse être étendue à 45-65 °C. La  $T_m$  finale des deux amorces ne doit pas différer de plus de 5 °C (Banaganapalli et al., 2019).
- Les répétitions de dinucléotides (par exemple, GCGCGCGCGC ou ATATATATAT) ou les séquences de base unique (par exemple, AAAAA ou CCCCC) doivent être évitées car elles peuvent provoquer un glissement le long du segment d'ADN amorcé et/ou la formation de structures en boucle en épingle à cheveux. Si cela est inévitable en raison de la nature du modèle d'ADN, n'incluez que des répétitions ou des séquences de base unique avec un maximum de 4 bases (Bustin et al., 2020).

### 1.4.3.4. Nucléotides

Les dNTP ou désoxynucléotides triphosphates Ce sont des unités simples des bases A, T, G et C, qui sont essentiellement des « éléments de base » pour les nouveaux brins d'ADN (Bird et al., 2023)

### 1.4.3.5. Les ions magnésium

Les ions magnésium ( $Mg^{2+}$ ) jouent un rôle crucial en tant que cofacteurs pour l'activité de l'ADN polymérase. Toutefois, la présence de ces ions libres est restreinte par leur propension à établir des complexes avec différents éléments de la réaction, y compris les dNTP, les amorces et les matrices d'ADN (Li et al., 2023).

## 1.4.4. Les étapes de la PCR

La PCR repose sur un cycle répété de trois étapes principales :

### 1.4.4.1. Dénaturation de l'ADN

Elle offre la possibilité de diviser les deux brins d'ADN grâce à la chaleur. Le mélange réactionnel est amené à 94 °C, température à laquelle les deux brins d'ADN se séparent (McDonald et al., 2024).

### 1.4.4.2. Hybridation des amorces

Deux amorces d'ADN d'environ 20 bases s'hybrident de façon spécifique grâce à la complémentarité des bases, sur un brin d'ADN ou son complémentaire. Cette opération est

## Chapitre 1. Revue de la littérature

---

réalisée à une température dépendante de la composition en bases puriques et pyrimidiques de ces amorces, en général entre 45 °C et 65 °C (Garibyan & Avashia, 2013b).

### 1.4.4.3. Élongation des amorces

Une ADN polymérase (la Taq polymérase est la plus utilisée) allonge les amorces en y incorporant des bases complémentaires de la séquence matrice. Cette procédure s'effectue à une température de 72 °C, considérée comme idéale pour l'activité de la polymérase. Elle synthétise l'ADN de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'.

Deux exemplaires de la séquence d'ADN cible sont obtenus à l'issue du premier cycle. À partir du troisième cycle, les amplicons émergent, ADN à double brin délimité par les amorces, répliques du fragment d'ADN ciblé.

Ils seront largement majoritaires à la fin de l'amplification. En 30 cycles (1 h 30 à 4 h), un grand nombre de copies sont générées, théoriquement 230 copies de la cible (Khehra et al., 2025c).

### 1.4.5. Visualisation des résultats de la PCR

La technique de l'électrophorèse sur gel d'agarose, relativement simple, permet de différencier des molécules biologiques comme l'ADN, l'ARN ou les protéines, principalement en fonction de leur taille, s'adapte constamment aux exigences grandissantes de la recherche biomédicale (Slater et al., 2000). Parmi ces techniques, l'électrophorèse sur gel d'agarose occupe une place centrale pour la séparation et la visualisation des produits d'amplification obtenus par PCR.

#### 1.4.5.1. Principe de l'électrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode relativement simple utilisée pour séparer des molécules biologiques, comme l'ADN, l'ARN ou les protéines, principalement en fonction de leur taille. Les acides nucléiques, chargés négativement en raison de leur squelette phosphate, migrent vers l'anode (pôle positif) sous l'influence d'un champ électrique (Wittmeier & Hummel, 2022).

L'agarose, extrait principalement d'algues rouges (*Gelidium*, *Gracilaria*), forme une matrice semi-solide lors de la gélification grâce à des associations non covalentes entre les polymères d'agarose. Cette matrice agit comme un tamis moléculaire où la taille des pores dépend de la concentration en agarose. Avant l'adoption des gels d'agarose, la séparation de l'ADN était réalisée par centrifugation sur gradients de densité de saccharose, méthode beaucoup moins précise (Lee et al., 2012).

### 1.4.5.2. Mécanisme de séparation

Lorsqu'un courant électrique est appliqué :

- L'ADN, ayant un rapport masse/charge uniforme, migre vers l'anode.
- Les plus petits fragments se déplacent plus rapidement à travers les pores du gel.
- La distance de migration est inversement proportionnelle au logarithme du poids moléculaire du fragment d'ADN.

Le modèle théorique expliquant cette migration est appelé "polarized reptation" : l'extrémité avant de la molécule avance et entraîne le reste du fragment à travers le gel.

Les principaux facteurs influençant la migration sont :

1. La taille de la molécule d'ADN.
2. La concentration d'agarose (plus elle est élevée, plus les petits fragments migrent efficacement).
3. La conformation de l'ADN (linéaire, circulaire, superenroulé).
4. La tension appliquée.
5. La présence de colorants intercalants comme le bromure d'éthidium (EtBr).
6. Le type de tampon utilisé pour l'électrophorèse (Lee et al., 2012).

### 1.4.5.3. Visualisation de l'ADN

Après séparation, les fragments d'ADN sont visualisés sous lumière UV grâce à des colorants fluorescents intercalants tels que le bromure d'éthidium, SYBR Green ou GelRed. Ces molécules s'intercalent entre les bases d'ADN, permettant ainsi leur détection (Green & Sambrook, 2019).

L'usage de gels d'agarose a transformé la biologie moléculaire, permettant l'évaluation rapide et exacte des produits PCR, en particulier pour :

- Vérifier le succès de l'amplification.
- Estimer la taille des amplicons.
- Préparer les fragments pour le clonage ou d'autres analyses (Raab et al., 2023).

### 1.5. Problématique et objectifs

#### 1.5.1. Problématique

Les macrophages, cellules immunitaires polyvalentes et fonctionnelles, issues des monocytes en circulation, se trouvent majoritairement dans tous les tissus du corps humain. Ils jouent un rôle central dans l'homéostasie tissulaire, la surveillance immunitaire et la défense contre les pathogènes, y compris *M. tuberculosis*, l'agent étiologique de la tuberculose qui est une maladie infectieuse chronique et potentiellement mortelle affectant principalement les poumons, mais peut également se disséminer à d'autres organes.

Dans le contexte de l'infection tuberculeuse, *M. tuberculosis* utilise les macrophages comme hôtes à l'intérieur des cellules. Leur activation et leur rôle sont étroitement associés à l'activation de divers facteurs de transcription, dont le facteur *NF-κB* qui joue un rôle dans la régulation de nombreux gènes liés aux réactions inflammatoires en générant des cytokines pro-inflammatoires comme l'*IL6*.

Plusieurs recherches ont prouvé que la vitamine D pourrait renforcer les systèmes de défenses immunitaires contre les infections, notamment en prolongeant l'effet bactéricide des macrophages par la stimulation de peptides antimicrobiens tels que la cathélicidine. La vitamine D influence aussi l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme l'*IL6* et la fonction du facteur de transcription *NF-κB*, qui jouent un rôle crucial dans la régulation de la réponse immunitaire lors de l'infection par *M. tuberculosis*. Dans ce contexte, il est pertinent de réaliser une PCR quantitative afin de mesurer les niveaux d'expression de ces gènes dans les macrophages, ce qui permettra d'évaluer précisément l'impact de la vitamine D sur la réponse immunitaire à l'infection.

#### 1.5.2. Objectif

L'objectif de ce travail est de concevoir des amorces spécifiques aux gènes *IL6* et *NFKB1* exprimés par le macrophage afin de quantifier par PCR leur expression lors de l'infection par *M. tuberculosis*.

#### 1.5.3. But

Le but majeur de cette étude est de comprendre comment la vitamine D renforce les défenses immunitaires contre la tuberculose, en se focalisant sur l'activité des macrophages et la régulation de la réponse inflammatoire.

## Chapitre 2. Matériel et méthodes

---

### Chapitre 2. Matériel et méthodes

#### 2.1. Conception d'amorces

La première étape importante pour réussir l'amplification d'une séquence d'ADN spécifique repose sur la conception méticuleuse d'amorces. Ces amorces, qui sont de courts fragments d'ADN simple brin synthétisés chimiquement, jouent un rôle d'initiateur indispensable au processus de réplication enzymatique (Kalendar et al., 2024).

L'aspect le plus crucial pour assurer une PCR efficace réside dans la qualité de la conception des primers. Des erreurs à ce niveau peuvent sérieusement nuire au déroulement de la réaction en chaîne par polymérase, allant jusqu'à son arrêt complet.

Pour une conception efficace d'amorces, l'emploi de différents instruments bio-informatiques s'avère indispensable (tableau 2.1).

**Tableau 2.1. Principaux facteurs influençant l'efficacité des amorces.**

<b>Critère</b>	<b>Exigence</b>
<b>Longueur</b>	ARN : 5-10 nt / ADN : 18-35 nt
<b>Température (Tm)</b>	Entre 55°C et 60°C
<b>Pourcentage GC</b>	Entre 40 % et 60 %
<b>Spécificité</b>	Ciblage unique de la séquence d'intérêt
<b>Complémentarité</b>	Éviter l'auto-complémentarité (structures secondaires)

#### 2.2. Outils

Pour une conception efficace d'amorces, l'emploi de différents instruments bio-informatiques s'avère indispensable (voir tableau 2.2).

## Chapitre 2. Matériel et méthodes

Tableau 2.2. Les outils bio-informatique qui utilisé pour la conception d’amorce.

Outils	Définition	Fonctions principales/ Ressources	Accès	Références
<b>NCBI</b>	Centre américain fondé en 1988, dépendent des NIH, fournissant un vaste éventail de ressources bio-informatiques gratuites	<ul style="list-style-type: none"> <li>- GenBank: séquences nucléotidiques</li> <li>- PubMed: bibliographie biomédicale</li> <li>- 35 bases de données incluant RefSeq, SRA, dbSNP, dbVar, PubChem, MMDB, Virus, etc.</li> <li>- Interfaces de recherche, APIs disponibles</li> </ul>	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov">https://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>	(Sayers et al., 2021)
<b>Ensemble</b>	Plateforme bio-informatique gratuite créée par EMBL-EBI et Sanger Institute, active depuis plus de 20 ans.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ressources génomiques multi-espèces (vertébrés et non-vertébrés)</li> <li>- Annotation de gènes, variantes, régions régulatrices</li> <li>- Outils pour analyse comparative, prédiction génétique et fonctionnelle</li> <li>- Intégration de données publiques (eucaryotes/procaryotes)</li> </ul>	<a href="https://www.ensembl.org">https://www.ensembl.org</a>	(Dyer et al., 2024).

## Chapitre 2. Matériel et méthodes

---

<b>UCSC <i>in-Silico</i> PCR</b>	Le service UCSC <i>In-Silico</i> PCR est un outil bio-informatique en ligne qui permet de simuler une réaction de PCR (Polymérase Chain Réaction) sur un génome de référence prédéfini.	Couramment utilisé pour : -Vérifier la spécificité des amorces avant de réaliser des expériences de PCR en laboratoire. -Prévoir la taille des produits PCR attendus pour des amorces données. -Identifier des appariements non spécifiques potentiels dans le génome. -Concevoir des amorces pour des applications telles que le génotypage, le clonage ou le diagnostic moléculaire.	<a href="http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr">http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr</a>	(Nassar et al., 2022)
----------------------------------	---	--	---	-----------------------

### 2.3. Conception des amorces pour amplifier le gène *IL6*

#### 2.3.1. Description du gène *IL6*

L'interleukine-6 (*IL6*) est une cytokine pléiotrope intervenant dans la modulation de la réponse immunitaire, l'inflammation et plusieurs processus physiologiques, y compris la régénération des tissus et le métabolisme. Elle est impliquée dans la réponse de phase aiguë lors des infections, des blessures ou l'inflammation (Kerkis et al., 2024).

Initialement, l'*IL6* a été caractérisée comme un agent stimulant les lymphocytes B (BSF-2), puis a été renommée en fonction de son action précise : IFN- $\beta$ 2, le facteur de stimulation des hépatocytes (HSF), le facteur de différenciation des cellules B (BCDF), le facteur de croissance de l'hybridome/du plasmocytome (HPGF), le facteur stimulant des cellules B-2 (BCSF-2), et l'inducteur macrophage-granulocyte type 2 (mgl-2A) ainsi que la thrombopoïétine (Assier et al., 2010, Kamimura et al., 2003).

Sur le plan structural, l'*IL6* est une glycoprotéine sécrétée de 26 kDa, composée de 212 résidus d'acides aminés organisés en quatre chaînes alpha. *IL6*, le gène qui code pour l'*IL6*, est localisé sur le bras court du chromosome 7 (Aladawy et al., 2022), spécifiquement en 7p15.3 (figure 2.1). Son architecture génique est caractérisée par une organisation en 5 exons et 4 introns, s'étendant sur une longueur d'environ 5 kilobases (kb). Cette structure génique complexe contribue à la régulation précise de l'expression de l'*IL6* et à la diversité de ses fonctions biologiques (Assier et al., 2010).

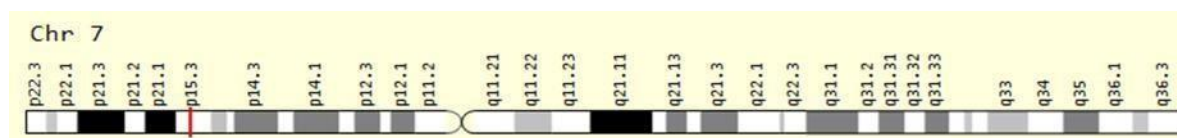


Figure 2.1. Localisation de gène *IL6*.

#### 2.3.2. Détermination de la séquence du gène *IL6*

La première étape dans la conception d'amorces spécifiques au gène *IL6* consiste à identifier sa séquence de référence. Cette séquence exacte est obtenue à partir de la base de données génomique Ensemble, accessible à l'adresse : <https://www.ensembl.org>.

## Chapitre 2. Matériel et méthodes

1. Choisir l'espèce  
2. Décrire le gène  
indiquer  
3. cliquer sur Go

Figure 2.2. La base de données Ensembl. (1) spécifier l'espèce Humaine. Ensuite (2) écrire le nom du gène *IL6* puis (3) cliquer sur GO pour afficher les résultats de la recherche.

Accéder à ce premier résultat. Vérifier que le résultat concerne bien le gène Interleukine 6 (IL6). Confirmer que la séquence ou les informations associées correspondent à l'espèce humaine (Homo sapiens).

Figure 2.3. Résultats de la recherche du gène *IL6*. Accéder sur le premier résultat et vérifier que le résultat concerne bien le gène *IL6* et qui correspond à l'espèce humaine (Human Gene) (encadrer en rouge).

La première page indique les informations générale du gène

Figure 2.4. Les caractéristiques du gène *IL6*. La plateforme présente les diverses propriétés du gène *IL6*. Pour visualiser la séquence de ce gène, qui sera mise en évidence en rouge, il est nécessaire de cliquer sur l'option "Séquence".

## Chapitre 2. Matériel et méthodes

- Puis, la Figure 2.5 présente la séquence du gène *IL6*. Dans cette illustration, les zones codantes (exons) sont signalées en rouge, alors que les zones non-codantes (introns) sont marquées en noir.



Figure 2.5. La séquence du gène *IL6* par la plateforme Ensembl.

Pour faciliter notre étude, nous utilisons des amorces spécifiques dirigées contre l'ensemble du gène *IL6*, couvrant à la fois les exons et les introns, comme le montre la figure 2.6. Cette séquence d'ADN a été enregistrée dans un fichier Word. Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes focalisés sur la partie de la séquence correspondant à l'exon 1 du gène *IL6*.

-Les exons sont indiqués en rouge, tandis que les séquences non codantes le sont en noir.

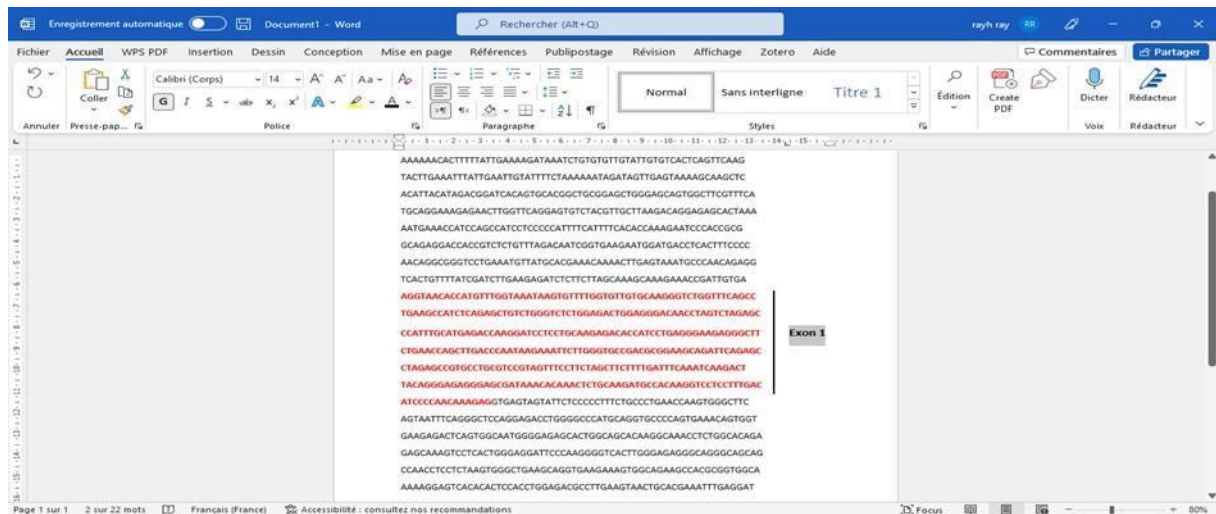


Figure 2.6. La séquence de l'exon 1 du gène *IL6*.

## Chapitre 2. Matériel et méthodes

### 2.3.3. Le design des Primer : L'outil Primer-BLAST

La conception des amorces spécifiques au gène *IL6* a été réalisée en utilisant l'outil Primer-BLAST du NCBI. Les figures 2.7 à 2.8 détaillent la procédure d'utilisation de cette plateforme.

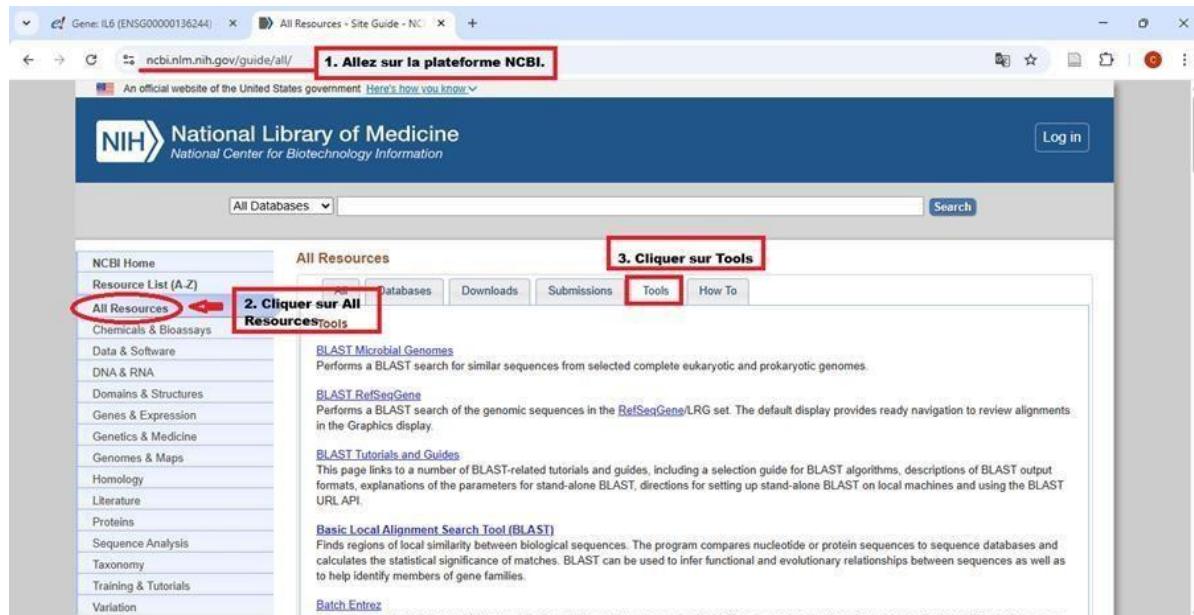


Figure 2.7. Le site NCBI.

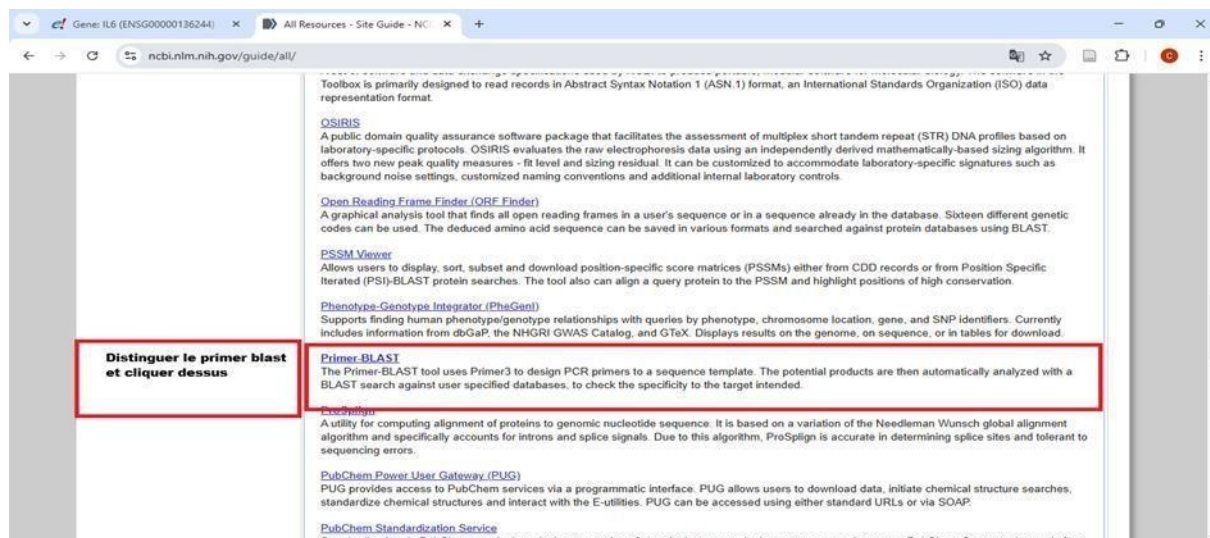


Figure 2.8. L'outil Primer-BLAST

Les étapes de conception des amorces par l'outil Primer-blast sont les suivantes :

**Etape 1 :** Insérer la séquence souhaitée dans l'interface du programme.

**Etape 2 :** Indiquer la position du nucléotide où commence l'amplification et la longueur maximale de L'élément désiré.

**Etape 3 :** Éliminer les pages non désirées (figure 2.9).

## Chapitre 2. Matériel et méthodes

**Etape 4 :** Sélectionnez 'show results in a new window', puis cliquez sur 'Get primers' (figure 2.10).

The screenshot shows the Primer-BLAST web interface. The browser tabs include 'Gene: IL6 (ENSG00000136244)', 'UCSC In-Silico PCR', 'Primer designing tool', and 'Primer-Blast results'. The URL is 'ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/'. The page title is 'Primer-BLAST' and the subtitle is 'A tool for finding specific primers'. The main heading is 'Primer-BLAST' with a sub-heading '1. la page du logiciel s'affichera'. Below this, there are tabs for 'Primer Parameters' and 'Primer Pairs'. The 'Primer Parameters' section includes fields for 'Enter accession, gi, or FASTA sequence', 'Range', 'Forward primer', and 'Reverse primer'. The 'Forward primer' field has '1' in the 'From' box and '480' in the 'To' box. The 'Reverse primer' field has '900' in the 'From' box and '6' in the 'To' box. The 'Primer Parameters' section also includes fields for 'PCR product size', '# of primers to return', and 'Primer melting temperature'. The 'Primer Pairs' section includes fields for 'Min', 'Max', 'Opt', and 'Max T<sub>m</sub> difference'. The 'Primer Parameters' section has a '2. Copier et coller la séquence d'intérêt encadrer ici et supprimer tout les espaces' annotation. The 'Range' section has a '3. Ecrire le nombre "1" dans la case "From"' annotation. The 'Forward primer' field has a '4. Ecrire le nombre de la "Forward primer"' annotation. The 'Reverse primer' field has a '5. Ecrire le nombre de la "Reverse primer"' annotation. The 'Reverse primer' field has a '6. Laisser la case libre' annotation.

**Figure 2.9. La page d'accueil de primer-blast.** (1) La page du logiciel s'affichera comme dans la figure dessus, (2) copier la région d'intérêt encadrer dans document Word et la coller dans la case « Enter accession, gi, or FASTA séquence » (encadrer en rouge), puis supprimer les espaces entre les lignes, ensuite (3,4,5,6) on détermine les amorces sens et antisens (Forward et Reverse primer).

✓ Par la suite, nous avons retenu certaines propriétés pour générer nos résultats.

The screenshot shows the 'Primer Pair Specificity Checking Parameters' section of the Primer-BLAST web interface. The 'Intron inclusion' section has 'Intron length range' with 'Min' at 1000 and 'Max' at 10000. The 'Primer Pair Specificity Checking Parameters' section has a 'Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow'. The 'Specificity check' section has 'Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template' checked. The 'Search mode' is set to 'Automatic'. The 'Database' is set to 'Genomes for selected eukaryotic organisms (primary assembly only)'. The 'Exclusion' section has 'Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix)' and 'Exclude uncultured/environmental sample sequences' checked. The 'Organism' is set to 'Homo sapiens'. The 'Entrez query (optional)' field is empty. The 'Primer specificity stringency' section has 'Primer must have at least 2 total mismatches to unintended targets, including at least 2 mismatches within the last 5 bps at the 3' end.' and 'Ignore targets that have 6 or more mismatches to the primer.' checked. The 'Max target amplicon size' is set to 4000. The 'Allow splice variants' section has 'Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input)' checked. The 'Get Primers' button is highlighted. The 'Show results in a new window' checkbox is checked. The 'Use new graphic view' checkbox is checked. The '4. Cliquer sur "Get Primers"' annotation is present.

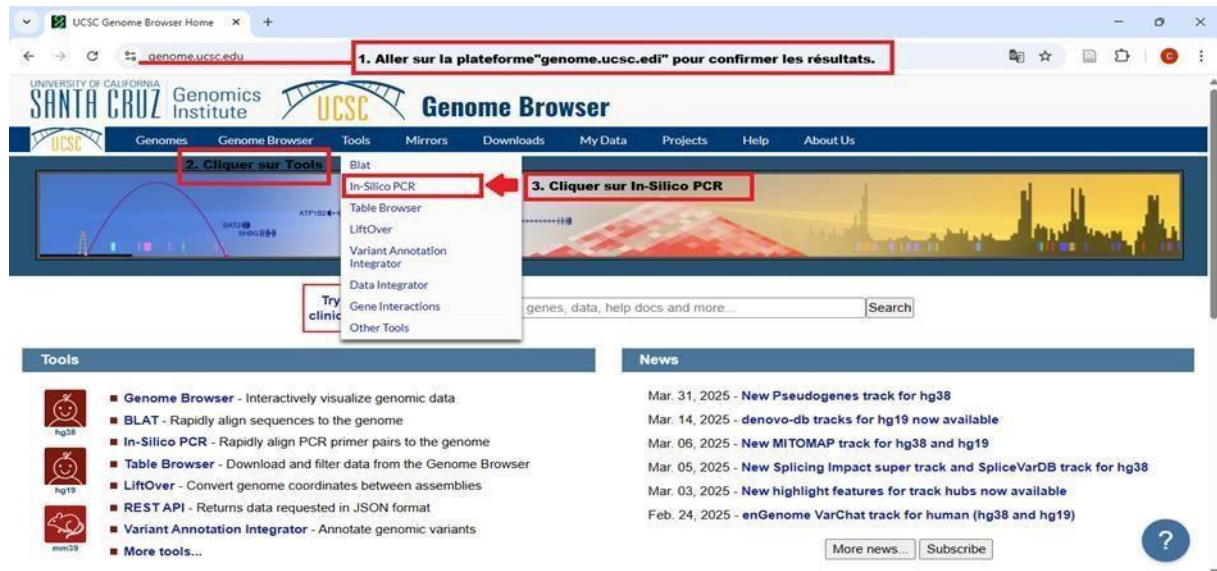
**Figure 2.10. Paramètres pour vérifier la spécificité des paires d'amorces.** Descendez la page jusqu'en bas, puis (1) cliquez sur la case où il est indiqué « RefSeq mRNA » et optez pour « Genomes for selected organisms », (2) assurez-vous de l'espèce choisie.

## Chapitre 2. Matériel et méthodes

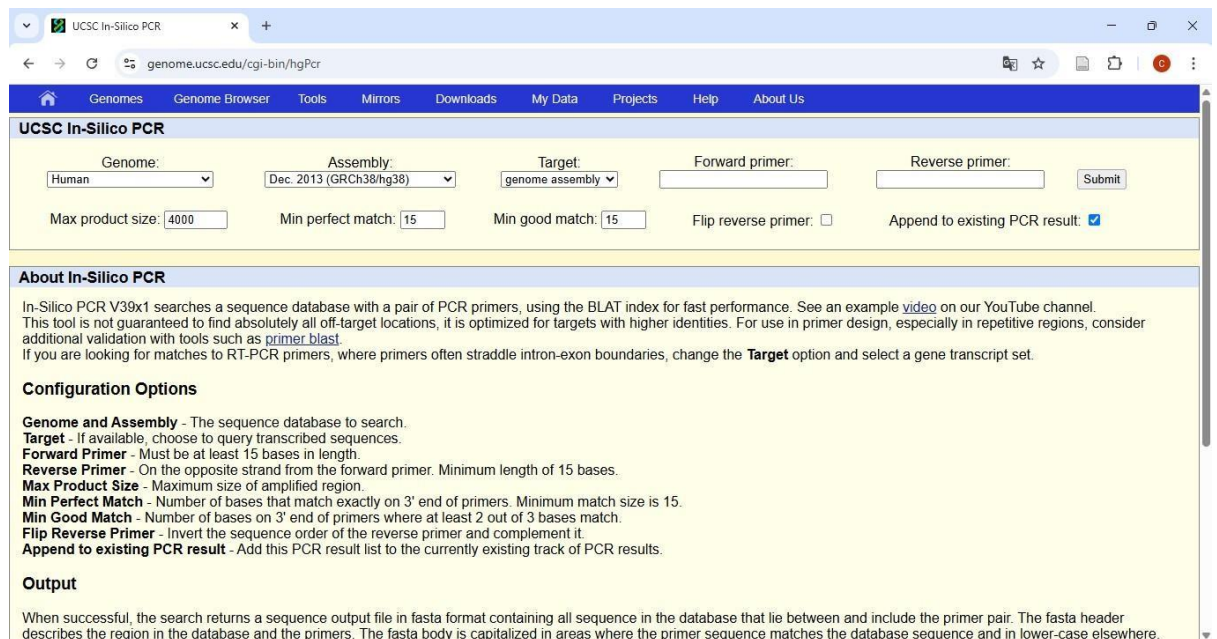
➤ Les amorces choisies doivent répondre aux critères cités dans le tableau 2.1 en haut.

### 2.3.4. Confirmation des résultats par *In-Silico* PCR

L'analyse de validation pour la paire d'amorces choisie a été effectuée en utilisant l'outil PCR *In-Silico* (PCR virtuelle), qui est accessible via le site genome.ucsc.edu.



**Figure 2.11. Plateforme du site « genome.ucsc.edu ».** Validation des résultats via la plateforme « UCSC genome browser » (1) Aller sur la plateforme « UCSC genome browser », (2) cliquer sur « Tools », (3) cliquer sur « *in-Silico* PCR ».



**Figure 2.12. Le site *In-Silico* PCR.**

### 2.4. Conception des amorces pour amplifier le gène *NFKB1*

#### 2.4.1. Description de gène *NFKB1*

Le facteur de transcription dimérique *NF-κB*, ou facteur nucléaire kappa B, a été découvert par Sen et Baltimore en 1986. Il a été initialement identifié dans les lymphocytes B pour sa capacité à activer la transcription de la chaîne légère kappa des immunoglobulines (Magnani et al., 2000). De plus, il est désormais reconnu comme un régulateur clé des réponses immunitaires, inflammatoires, de la prolifération, de différenciation et de survie cellulaire dans pratiquement toutes les cellules eucaryotes (Mitchell et al., 2016).

Le gène *NFKB1*, situé sur le chromosome 4 spécifiquement en 4q24 (figure 2.13), code une protéine de 105 kDa. Cette dernière peut être partiellement clivée de manière co-traductionnelle par le protéasome 26S, générant une forme plus courte de 50 kDa. La protéine complète (p105) agit comme un inhibiteur spécifique des protéines de la famille Rel, tandis que la forme tronquée (p50) constitue une sous-unité du complexe NF-κB, impliquée dans la fixation à l'ADN. Ce complexe transcriptionnel est activé par divers signaux intra et extracellulaires, tels que les cytokines, les espèces réactives de l'oxygène, les rayons UV ou encore les composés d'origine bactérienne ou virale. Par cette voie, *NFKB1* joue un rôle crucial dans la régulation de l'immunité, de l'inflammation et de la survie cellulaire.

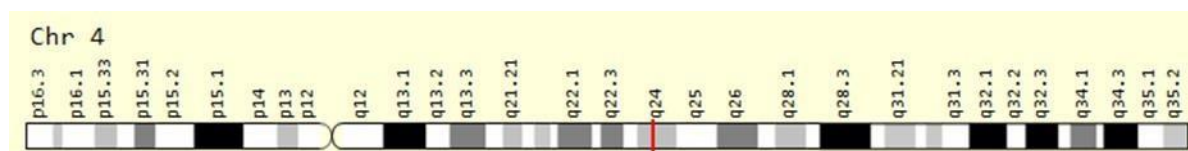


Figure 2.13. Localisation de gène *NFKB1*

#### 2.4.2. Détermination de la séquence du gène *NFKB1*

L'élaboration d'amorces spécifiques pour le gène *NFKB1* débute par la détermination de sa séquence de référence à partir de la base de données génomique Ensembl. On suit les mêmes étapes qu'on a fait pour le gène *IL6*.

## Chapitre 2. Matériel et méthodes

The screenshot shows the Ensembl genome browser interface for the *NFKB1* gene. The browser address bar indicates the URL: `ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core&g=ENSG00000109320;r=4:102501330-102617302`. The page title is "Human (GRCh38.p14) Gene: NFKB1". A green box highlights the text "La première page indique les informations générale de gène". The main content area includes a "Summary" section with the following information:

- Name: *NFKB1* (HGNC Symbol)
- MANE: This gene contains MANE Select [ENST00000226574](#), [ENSP00000226574](#)
- UniProtKB: This gene has proteins that correspond to the following UniProtKB identifiers: [P19838](#)
- 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
- CCDS: This gene is a member of the Human CCDS set: [CCDS3657.1](#), [CCDS54783.1](#)
- LRG: [LRG\\_1316](#) provides a stable genomic reference framework for describing sequence variants for this gene
- Ensembl version: ENSG00000109320.14
- Other assemblies: This gene maps to [103,422,487-103,538,459](#) in GRCh37 coordinates. View this locus in the GRCh37 archive: [ENSG00000109320](#)

Figure 2.14. Les caractéristiques du gène *NFKB1*.

La Figure 2.15 présente la séquence du gène *NFKB1*. Dans cette représentation, les exons qui correspondent aux zones codantes sont mis en évidence en rouge, alors que les introns, qui symbolisent les zones non codantes, sont affichés en noir.

The screenshot shows the Ensembl genome browser interface for the *NFKB1* gene sequence. The browser address bar indicates the URL: `ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Sequence?db=core&g=ENSG00000109320;r=4:102501330-102617302`. The page title is "Human (GRCh38.p14) Gene: NFKB1". The main content area displays the DNA sequence of the gene, with exons highlighted in red and introns in black. The sequence is displayed in a text area with the following text:

```
>chromosome:GRCh38:4:102500730:102617902:1
CCACCAAAAACCAAGTAGAGGGTATACCTTACTGGGCAAGTCGTTATGATAAGAAA
ATTTAGTTTAACTGTGAGAGATGTGAATGTAACTGACACAGCCCTAAATGAGATATA
CGAGTGGGTTATTTTATATATGAGGATGCTGGATGAGTGGGAGGAGGAGGAGGAGG
GGGCTGCGCTTAAAGGGCTATGAGAGGATGACTTATCAAGGCACTGCCACCGGCGCC
GGCTCGGTGCTGCGGTTCCCGGACCATGATTGGGCGGCGAGGGGCTTCCGGGGG
CTTCCCTACCGCTCCAGCCCTTGGGATTCGGGAGGCGCTGCTAGGAGCCAGAGCCCC
GCAGGGGCGGGGCTCCAGGGGCTTAAAGGCGGCGGCTTCCCGGGGCGGCGGCGGCGG
CCCGAGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGG
AGAGTGGGGGCTTCCCGGACCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
CGGCTGCTGCGGCTTGTGTATGCTCTCTGAGGCTGAGTGGGAGTTCAGGAGGAGG
TGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
GAGGTTTCCAGCCCGGAGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGG
GGTGGGGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
AGCCAGCGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGG
CCCGGCGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGG
TGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
GCAGGGGCTAGTGGGGGAGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGG
CCCGGCGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGG
CAGCCCACTGGGGGATGGTGAAGAGGTTGGAGTGGCTGGGGGCGGGGAGGAGGAGG
AGGTGGGTTGGTGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
AGAGTGGTGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
GGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
ACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACAC
AGCTGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
GGCTGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
TTGATTTAGAACTCTTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
AGGATTTAGAACTCTTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
CAGCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
```

Figure 2.15. La séquence du gène *NFKB1* par la plateforme Ensembl.

Dans le contexte de notre recherche, nous avons fait appel à des amorces spécifiques qui ciblent la totalité du gène *NFKB1*, y compris les exons et les introns, comme illustré dans la figure 2.16. La séquence d'ADN obtenue a été sauvegardée dans un fichier Word. Nous avons ensuite porté notre attention sur la région correspondant à l'exon 12 du gène *NFKB1*.

## Chapitre 2. Matériel et méthodes

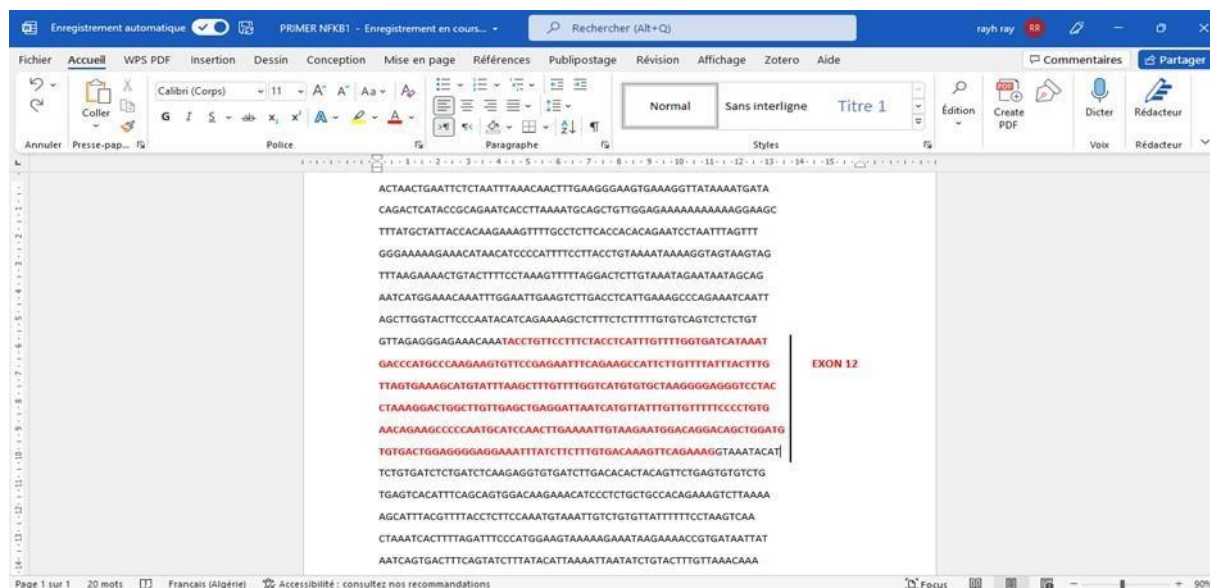


Figure 2.16. La séquence de l'exon 12 du gène *NFKB1*.

La conception des amorces spécifiques pour le gène *NFKB1* a été effectuée à l'aide de l'outil Primer-BLAST, disponible sur le site du NCBI. On a appliqué le même processus que pour la création des amorces destinées au gène *IL6*. Les amorces choisies doivent répondre aux critères qui ont été cités dans le tableau 2.1.

### 2.4.3. Confirmation des résultats par *In-Silico* PCR

L'analyse de validation pour la paire d'amorces choisie a été effectuée en utilisant l'outil PCR *In-Silico* (PCR virtuelle), qui est accessible via le site [genome.ucsc.edu](http://genome.ucsc.edu).

## Chapitre 3. Résultats

### Chapitre 3. Résultats

#### 3.1. Résultats de la conception des amorces pour le gène *IL6*

##### 3.1.1. Résultats du Primer-BLAST

C'est grâce à la plateforme Ensembl que nous avons découvert que le gène *IL6* se compose de 4 introns et 5 exons. Pour notre étude, nous avons retenu l'exon 1 comme cible. Le logiciel Primer-BLAST a généré dix paires d'amorces différentes (figure 3.1). Parmi celles-ci, nous avons sélectionné la paire numéro 3 et 10, et cela en raison de son respect des conditions mentionnées dans le tableau 2.1.

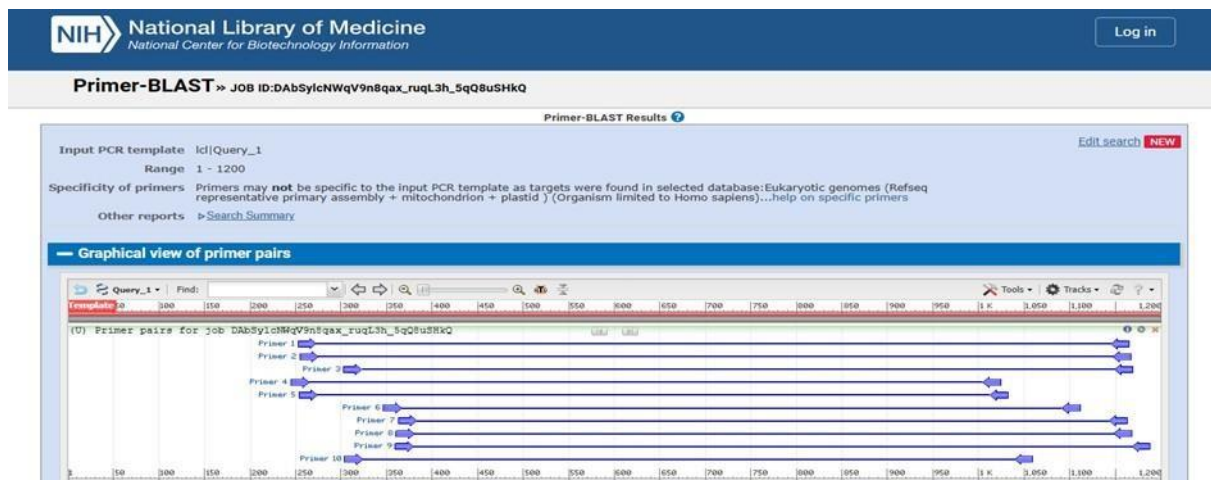


Figure 3.1. Résultat de l'outil Primer-blast

✓ Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 3.2 et 3.3.

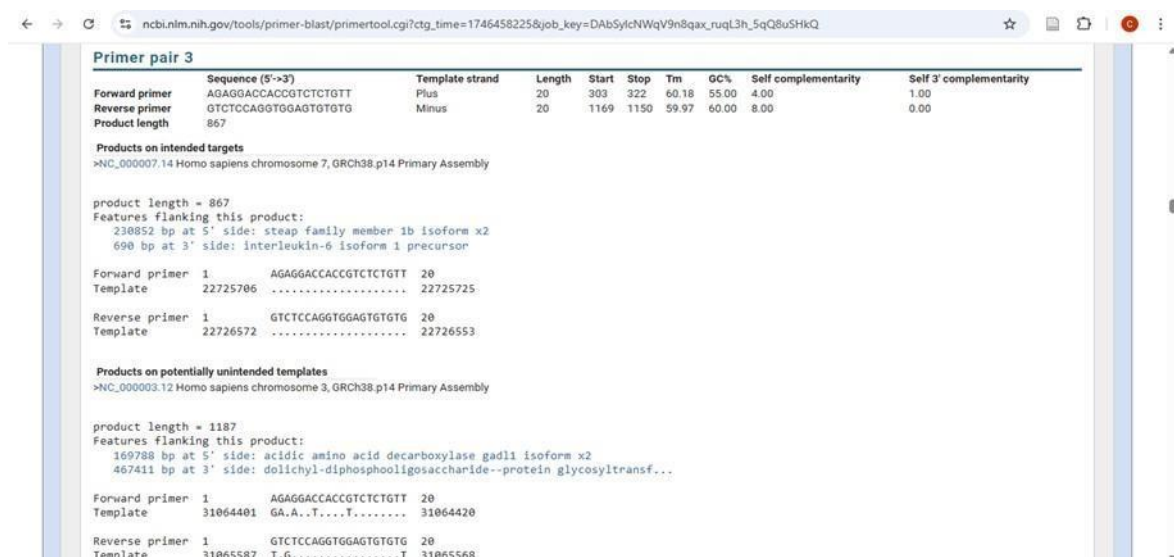


Figure 3.2. Primer pair 3.

## Chapitre 3. Résultats

Forward primer	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GAGGACCACCGTCTCTGTT	Plus	20	304	323	59.32	55.00	3.00	0.00
Reverse primer	AGTGACCCCTGGGAATCCT	Minus	20	1059	1040	60.18	55.00	5.00	3.00
Product length	756								

**Products on intended targets**  
 >NC\_000007.14 Homo sapiens chromosome 7, GRCh38.p14 Primary Assembly  
 product length = 756  
 Features flanking this product:  
 238853 bp at 5' side: steap family member 1b isoform x2  
 800 bp at 3' side: interleukin-6 isoform 1 precursor

**Products on potentially unintended templates**  
 >NC\_000004.12 Homo sapiens chromosome 4, GRCh38.p14 Primary Assembly  
 product length = 1528  
 Features flanking this product:  
 66958 bp at 5' side: insulin-like growth factor-binding protein 7 isoform 2 pr...  
 4020251 bp at 3' side: uncharacterized protein

Figure 3.3. Primer pair 10.

Le choix de la bonne paire d'amorces a été basé sur les critères suivants :

- L'amorce spécifique ne doit pas dépasser 1000 bases, car la PCR ne peut pas amplifier une séquence de plus de 1000 bases.
- Le pourcentage de GC devrait se situer entre 40 % et 60 %.
- Pour une hybridation optimale, l'amorce nécessite une température de 55°C à 60°C.
- Les températures d'hybridation des deux amorces (sens et anti-sens) doivent être le plus proches possibles l'une de l'autre, car lors d'une technique PCR la température d'hybridation est programmée en une seule valeur.
- Les produits non spécifiques de l'amorce choisie doivent tous dépasser 1000 bases.

Forward primer	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AGAGGACCACCGTCTCTGTT	Plus	20	303	322	60.18	55.00	4.00	1.00
Reverse primer	GTCTCCAGGTGGAGTGTGTG	Minus	20	1169	1150	59.97	60.00	8.00	0.00
Product length	867								

**Products on intended targets**  
 >NC\_000007.11 Homo sapiens chromosome 7, GRCh38.p14 Primary Assembly  
 product length = 867  
 Features flanking this product:  
 238852 bp at 5' side: steap family member 1b isoform x2  
 690 bp at 3' side: interleukin-6 isoform 1 precursor

**Products on potentially unintended templates**  
 >NC\_000003.12 Homo sapiens chromosome 3, GRCh38.p14 Primary Assembly  
 product length = 1187  
 Features flanking this product:  
 169788 bp at 5' side: acidic amino acid decarboxylase gad1 isoform x2  
 467411 bp at 3' side: dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransf...

Figure 3.4. Résultats du Primer-BLAST. (1) Il est nécessaire de vérifier la longueur des amorces, leurs températures d'hybridation et le pourcentage GC, puis (2) il faut s'assurer qu'il s'agit bien de l'espèce et du chromosome du gène voulu, puis (3) vérifier la longueur du produit spécifique < 1000 paire de base.

>NC\_000008.11 Homo sapiens chromosome 8, GRCh38.p14 Primary Assembly

product length = 2085

Features flanking this product:  
 5526 bp at 5' side: zinc finger protein snai2  
 143956 bp at 3' side: pancreatic progenitor cell differentiation and proliferat...

Reverse primer 1 GTCTCCAGGTGGAGTGTGTG 20  
 Template 48928874 T...A.CT..... 48928855

Reverse primer 1 GTCTCCAGGTGGAGTGTGTG 20  
 Template 48926790 .C.....TT.G..... 48926809

>NC\_000019.10 Homo sapiens chromosome 19, GRCh38.p14 Primary Assembly

product length = 1357

Features associated with this product:  
 small integral membrane protein 17

Reverse primer 1 GTCTCCAGGTGGAGTGTGTG 20  
 Template 56649150 AA.....TG.....C 56649161

Reverse primer 1 GTCTCCAGGTGGAGTGTGTG 20  
 Template 56647794 .....T....T.....A 56647813

>NC\_000012.12 Homo sapiens chromosome 12, GRCh38.p14 Primary Assembly

product length = 3770

Features flanking this product:  
 128647 bp at 5' side: transcriptional enhancer factor tef-3 isoform 3  
 28927 bp at 3' side: tetraspanin-9 isoform x1

**s'assurer que toutes les produits "Aspécifique" ont une longueur supérieur de 1000 paire de bases pour éviter que la PCR n'amplifie d'autre produit**

**Figure 3.5. Résultats du Primer-BLAST.** Il faut vérifier que la longueur du produit spécifique est inférieure à 1000pb et s'assurer que tous les produits qui ne sont pas spécifiques ont une longueur supérieure à 1000pb.

### 3.1.2. Résultats d'*In-silico* PCR du gène *IL6*

Pour valider nos résultats, nous avons utilisé le programme « *in-silico* PCR » disponible sur le site [www.genome.ucsc.edu](http://www.genome.ucsc.edu) (figure 3.6). Cet outil nous a permis de localiser notre produit d'amplification sur le chromosome 7, confirmant ainsi la spécificité et la fiabilité des amorces sélectionnées.

Genomes Genome Browser Tools Mirrors Downloads My Data Projects Help About Us

**UCSC In-Silico PCR**

Genome: **Human** Assembly: Dec. 2013 (GRCh38/hg38) Target: genome assembly

1. Assurer l'espèce voulue

2. Introduire la séquence de la "forward primer" Forward primer: AGAGGACCACCGTCTCTGT

3. Introduire la séquence de la "Reverse primer" Reverse primer: GTCTCCAGGTGGAGTGTGT

4. cliquer ici Submit

Max product size: 4000 Min perfect match: 15 Min good match: 15 Flip reverse primer:  Append to existing PCR result:

**About In-Silico PCR**

In-Silico PCR V39x1 searches a sequence database with a pair of PCR primers, using the BLAT index for fast performance. See an example [video](#) on our YouTube channel. This tool is not guaranteed to find absolutely all off-target locations, it is optimized for targets with higher identities. For use in primer design, especially in repetitive regions, consider additional validation with tools such as [primer blast](#). If you are looking for matches to RT-PCR primers, where primers often straddle intron-exon boundaries, change the **Target** option and select a gene transcript set.

**Configuration Options**

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

**Output**

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

**Figure 3.6. Confirmation des résultats sur la plateforme « UCSC genome browser ».** (1) s'assurer l'espèce voulue. (2) Insérez la séquence de l'amorce Forward (Forward Primer). (3) Insérez la séquence de l'amorce anti-sens (Reverse Primer) et (4) Appuyez sur le bouton de soumission.

# Chapitre 3. Résultats

UCSC In-Silico PCR

chr7:22725706-22726572 (867bp) AGAGGACCACTCTCTGTT GTCTCCAGGTGGAATGTGTG

vérifier que c'est bien le chromosome et la longueur du gène voulu

Forward Primer

L'inverse de la "Reverse Primer" et sa complémentaire

Primer Melting Temperatures

Forward: 58.7 C agagaccaccctctctgtt  
Reverse: 59.1 C gtctccaggtggatgtgtg

The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration. The code to calculate the melting temp comes from [Primer3](#), the formula by Rychlik W, Spencer WJ and Rhoads RE NAR 1990, which can be activated in Primer3 with PRIMER\_TM\_FORMULA=0.

Help

[What is chr\\_alt & chr\\_fix?](#)  
[Replicating in-Silico PCR results on local machine](#)

Figure 3.7. Résultats de la confirmation. Un seul résultat est affiché, comme illustré ci-dessus. Il convient de vérifier si la taille du produit et le chromosome correspondent bien à ceux du gène *IL6*.

## 3.2. Résultats de la conception des amorces du gène *NFKB1*

### 3.2.1. Résultats du Primer-BLAST

Grâce à la plateforme Ensemble, nous avons établi que le gène *NFKB1* est constitué de 28 introns et 27 exons. Dans le cadre de notre étude, nous avons choisi de cibler l'exon 12. L'outil Primer-BLAST a permis de générer dix paires d'amorces différentes (figure 3.8). Parmi celles-ci, nous avons retenu la paire numéro 1, car elle répond aux critères spécifiés.

Primer-BLAST Results

Input PCR template Id|Query\_1 [Edit search](#) **NEW**

Range 1 - 1080

Specificity of primers Primers may **not** be specific to the input PCR template as targets were found in selected database: Eukaryotic genomes (Refseq representative primary assembly + mitochondrion + plastid) (Organism limited to Homo sapiens)...help on specific primers

Other reports: [Search Summary](#)

Graphical view of primer pairs

Primer 1  
Primer 2  
Primer 3  
Primer 4  
Primer 5  
Primer 6  
Primer 7  
Primer 8  
Primer 9  
Primer 10

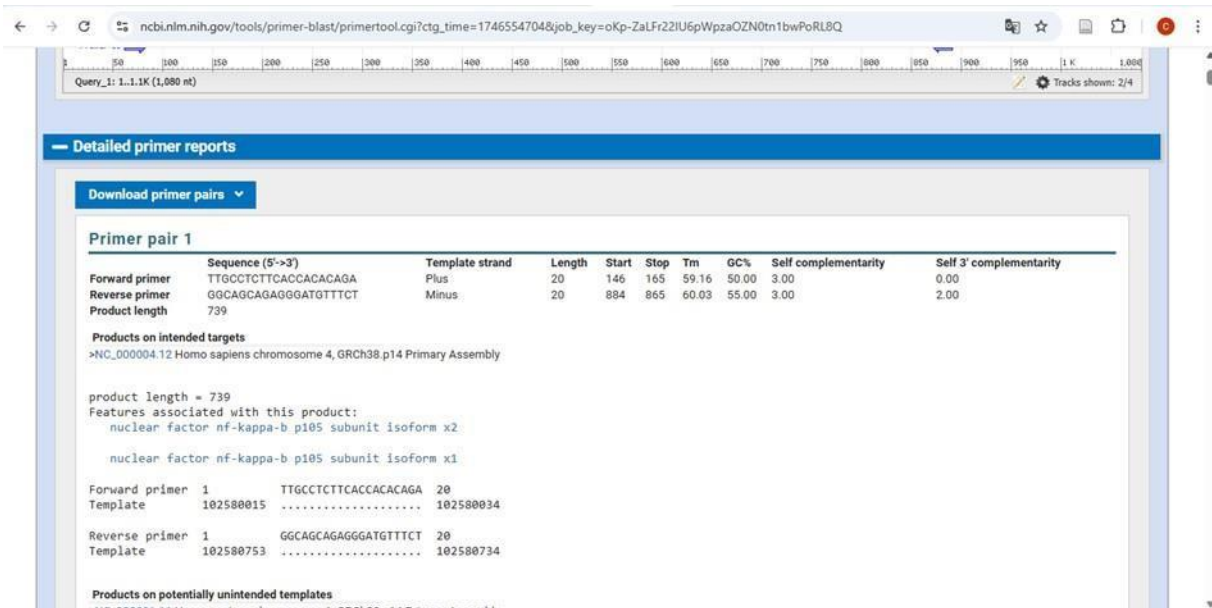
Query\_1: 1..1.1K (1,080 nt)

Detailed primer reports

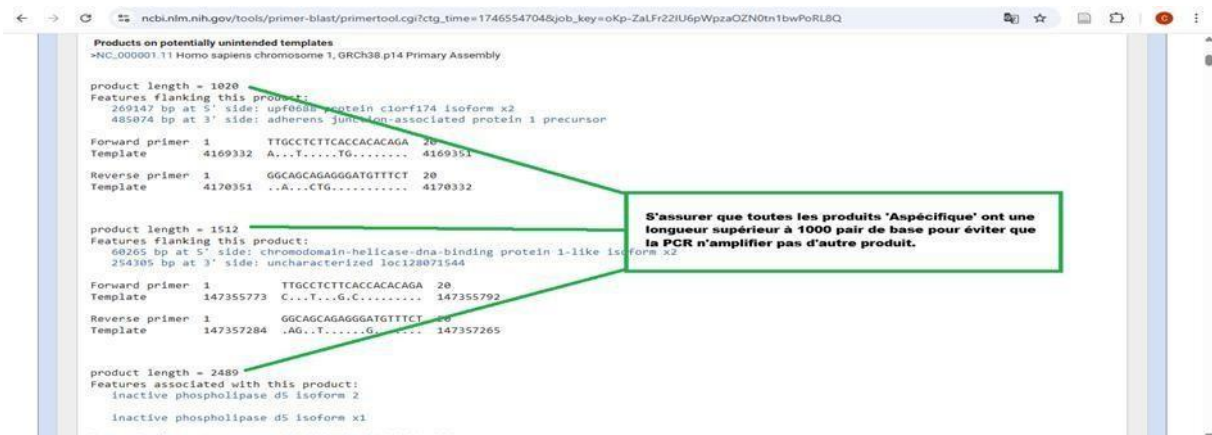
Figure 3.8 Résultat de l'outil Primer-blast

## Chapitre 3. Résultats

Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 3.9.



**Figure 3.9. Résultats du Primer-BLAST.** (1) Il est nécessaire de vérifier la longueur des amorces, leurs températures d'hybridation et le pourcentage GC, puis (2) il faut s'assurer qu'il s'agit bien de l'espèce et du chromosome du gène voulu, puis (3) vérifier la longueur du produit spécifique < 1000paire de base.

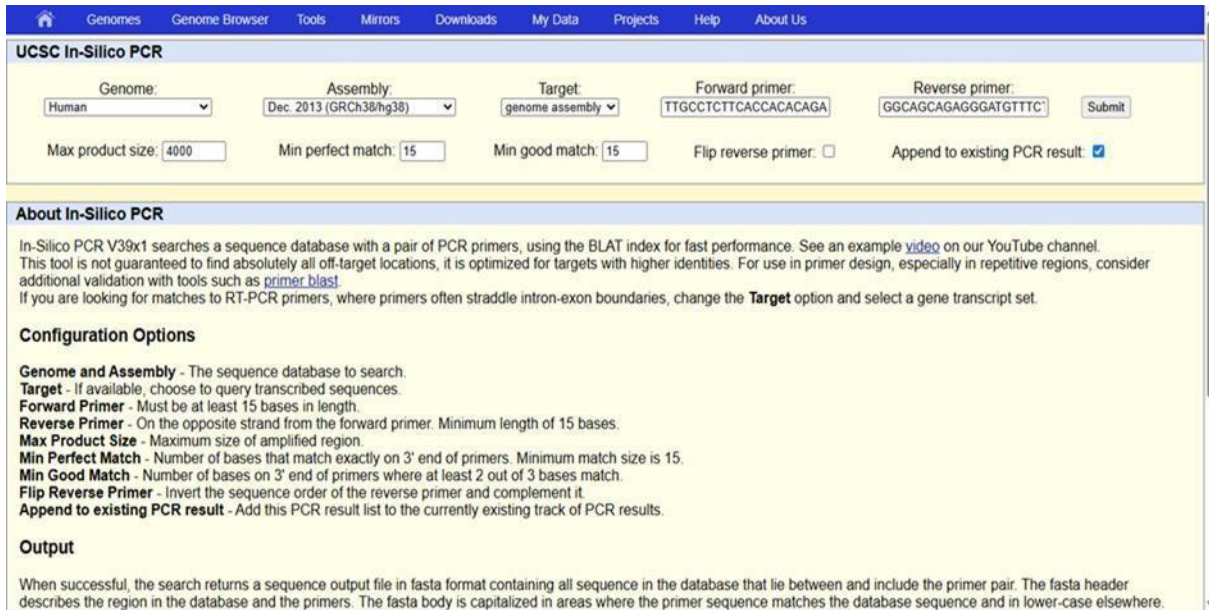


**Figure 3.10. Résultats du Primer-BLAST.** Il faut vérifier que la longueur du produit spécifique est inférieure à 1000pb et s'assurer que tous les produits qui ne sont pas spécifiques ont une longueur supérieure à 1000pb.

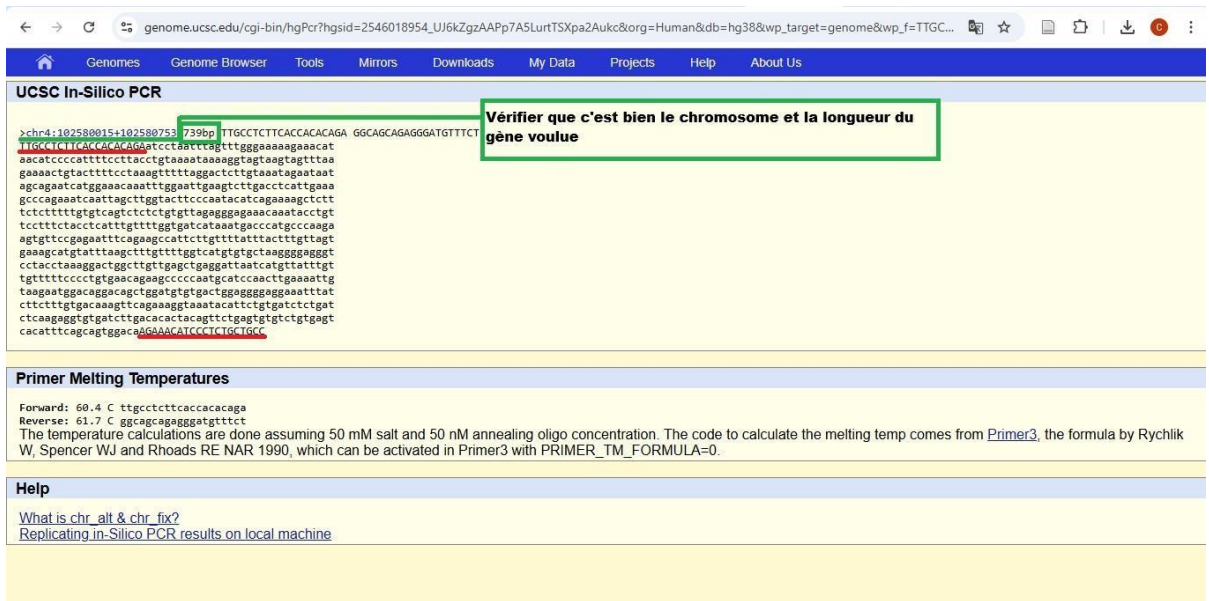
### 3.2.2. Résultats d'*In-silico* PCR du gène *NFKB1*

Dans le but de valider nos résultats, nous avons utilisé le programme « *in-silico* PCR » disponible sur le site [www.genome.ucsc.edu](http://www.genome.ucsc.edu) (figure 3.11). Cet outil a permis de situer notre produit d'amplification sur le chromosome 4, attestant de la spécificité et de la fiabilité des amorces employées.

# Chapitre 3. Résultats



**Figure 3.11. Confirmation des résultats sur la plateforme « UCSC genome browser ».** (1) s’assurer l’espèce voulue. (2) Insérez la séquence de l'amorce Forward (Forward Primer). (3) Insérez la séquence de l'amorce anti-sens (Reverse Primer) et (4) appuyez sur le bouton de soumission.



**Figure 3.12. Résultats de la confirmation.** Un seul résultat est affiché, comme illustré ci-dessus Il faut contrôler si les dimensions du produit et le chromosome associé coïncident avec ceux du gène *NFKB1*.

### Chapitre 4. Conclusions et perspectives

La tuberculose est une maladie infectieuse chronique grave, causée principalement par des bactéries appelée *M. tuberculosis*. Elle affecte les poumons et demeure un problème de santé publique majeur à l'échelle mondiale.

Les macrophages sont des cellules immunitaires capables d'adopter différents rôles selon les signaux qu'ils reçoivent. Lors de l'infection, ils expriment des gènes comme *IL6* et *NFKB1*, impliqués dans la réponse inflammatoire. Ces gènes sont influencés par la vitamine D, connue pour ses effets immunomodulateurs.

Dans cette étude, nous avons élaboré des amorces pour les gènes *IL6* (exon 1) et *NFKB1* (exon 12), en faisant appel à des instruments bio-informatiques comme Primer-BLAST et la PCR *in-silico*. Les amorces sélectionnées respectent les critères de longueur, température de fusion, pourcentage de GC et spécificité. La validation *in silico* a démontré la fiabilité des amorces sélectionnées

Ces amorces serviront de base à des études futures visant à analyser l'effet de la vitamine D sur l'expression des gènes *IL6* et *NFKB1* chez les macrophages infectés par *M. tuberculosis*. Ce travail constitue une étape clé pour mieux comprendre le lien entre immunité, inflammation et modulation par la vitamine D.

Ce travail nous a permis de découvrir les bases de la conception d'amorces, de maîtriser des outils bio-informatiques, et de mieux comprendre l'importance de la PCR dans l'étude de l'expression génique. Il nous a également donné envie de continuer à explorer la recherche dans le domaine de l'immunologie et des maladies infectieuses.

### Chapitre 5. Bibliographie

- Agliardi, C., Guerini, F. R., Bolognesi, E., Zanzottera, M., & Clerici, M. (2023). VDR Gene Single Nucleotide Polymorphisms and Autoimmunity: A Narrative Review. *Biology*, 12(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/biology12070916>
- Ahmad, F., Rani, A., Alam, A., Zarin, S., Pandey, S., Singh, H., Hasnain, S. E., & Ehtesham, N. Z. (2022a). Macrophage: A Cell with Many Faces and Functions in Tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, 13, 747799. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.747799>
- Aladawy, S. A., Adel, L. A., Abdel Salam, S. A., Raafat, R. H., & Khattab, M. A. (2022). Polymorphism in promotor region of IL6 gene as a predictor for severity in COVID -19 patients. *The Egyptian Journal of Immunology*, 29(2), 1-9.
- Almeida-da-Silva, C. L. C., Savio, L. E. B., Coutinho-Silva, R., & Ojcius, D. M. (2023). The role of NOD-like receptors in innate immunity. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1122586>
- Alonso, N., Zelzer, S., Eibinger, G., & Herrmann, M. (2023). Vitamin D Metabolites: Analytical Challenges and Clinical Relevance. *Calcified Tissue International*, 112(2), 158-177. <https://doi.org/10.1007/s00223-022-00961-5>
- Alzohily, B., AlMenhali, A., Gariballa, S., Munawar, N., Yasin, J., & Shah, I. (2024). Unraveling the complex interplay between obesity and vitamin D metabolism. *Scientific Reports*, 14, 7583. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-58154-z>
- Amarine-Ferry, M.-C. (s. d.). *L'impact de la vitamine D sur la physiopathologie parodontale*.
- Apeku, E., Tantuoyir, M. M., Zheng, R., & Tanye, N. (2024). Exploring the polarization of M1 and M2 macrophages in the context of skin diseases. *Molecular Biology Reports*, 51(1), 269. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-09014-y>
- Apte, A., & Daniel, S. (2009). PCR Primer Design. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009(3), pdb.ip65. <https://doi.org/10.1101/pdb.ip65>
- Arandjelovic, S., & Ravichandran, K. S. (2015). Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nature immunology*, 16(9), 907-917. <https://doi.org/10.1038/ni.3253>
- Asghari, A., Jafari, F., Jameshorani, M., Chiti, H., Naseri, M., Ghafourirankouhi, A., Kooshkaki, O., Abdshah, A., & Parsamanesh, N. (2022a). Vitamin D role in hepatitis B : Focus on immune system and genetics mechanism. *Heliyon*, 8(11). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11569>
- Assier, E., Boissier, M.-C., & Dayer, J.-M. (2010). Interleukine-6 : De la découverte de la cytokine au développement d'un traitement ciblé. *Revue du Rhumatisme*, 77, S16-S22. [https://doi.org/10.1016/S1169-8330\(10\)70004-1](https://doi.org/10.1016/S1169-8330(10)70004-1)

- Athanassiou, L., Kostoglou-Athanassiou, I., Koutsilieris, M., & Shoenfeld, Y. (2023). Vitamin D and Autoimmune Rheumatic Diseases. *Biomolecules*, *13*(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/biom13040709>
- Augenstreich, J., Arbues, A., Simeone, R., Haanappel, E., Wegener, A., Sayes, F., Le Chevalier, F., Chalut, C., Malaga, W., Guilhot, C., Brosch, R., & Astarie-Dequeker, C. (2017). ESX-1 and phthiocerol dimycocerosates of *Mycobacterium tuberculosis* act in concert to cause phagosomal rupture and host cell apoptosis. *Cellular Microbiology*, *19*(7). <https://doi.org/10.1111/cmi.12726>
- Augenstreich, J., Haanappel, E., Sayes, F., Simeone, R., Guillet, V., Mazeres, S., Chalut, C., Mourey, L., Brosch, R., Guilhot, C., & Astarie-Dequeker, C. (2020). Phthiocerol Dimycocerosates From *Mycobacterium tuberculosis* Increase the Membrane Activity of Bacterial Effectors and Host Receptors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*, 420. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00420>
- Bain, C. C., & Mowat, A. Mcl. (2014). Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Immunological Reviews*, *260*(1), 102-117. <https://doi.org/10.1111/imr.12192>
- Bajgar, A., & Krejčová, G. (2023). On the origin of the functional versatility of macrophages. *Frontiers in Physiology*, *14*, 1128984. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1128984>
- Banaganapalli, B., Shaik, N. A., Rashidi, O. M., Jamalalail, B., Bahattab, R., Bokhari, H. A., Alqahtani, F., Kaleemuddin, M., Al-Aama, J. Y., & Elango, R. (2019). In Silico PCR. In N. A. Shaik, K. R. Hakeem, B. Banaganapalli, & R. Elango (Éds.), *Essentials of Bioinformatics, Volume I: Understanding Bioinformatics : Genes to Proteins* (p. 355-371). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-02634-9\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-030-02634-9_16)
- Basak, U., Sarkar, T., Mukherjee, S., Chakraborty, S., Dutta, A., Dutta, S., Nayak, D., Kaushik, S., Das, T., & Sa, G. (2023). Tumor-associated macrophages : An effective player of the tumor microenvironment. *Frontiers in Immunology*, *14*, 1295257. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1295257>
- Bashir, S., Sharma, Y., Elahi, A., & Khan, F. (2016). Macrophage polarization : The link between inflammation and related diseases. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]*, *65*(1), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s00011-015-0874-1>
- Behzatoglu, K. (2021). Osteoclasts in Tumor Biology : Metastasis and Epithelial-Mesenchymal-Myeloid Transition. *Pathology Oncology Research: POR*, *27*, 609472. <https://doi.org/10.3389/pore.2021.609472>
- Bird, A. R., Molloy, J. C., & Hall, E. A. H. (2023). Biocatalytic synthesis of 2'-deoxynucleotide 5'-triphosphates from bacterial genomic DNA : Proof of principle. *Biotechnology and Bioengineering*, *120*(6), 1531-1544. <https://doi.org/10.1002/bit.28374>

- Bissonnette, E. Y., Lauzon-Joset, J.-F., Debley, J. S., & Ziegler, S. F. (2020). Cross-Talk Between Alveolar Macrophages and Lung Epithelial Cells is Essential to Maintain Lung Homeostasis. *Frontiers in Immunology*, 11, 583042. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.583042>
- Blum, J. S., Wearsch, P. A., & Cresswell, P. (2013). Pathways of Antigen Processing. *Annual review of immunology*, 31, 443-473. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095910>
- Bogdan, C. (2015). Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: An update. *Trends in Immunology*, 36(3), 161-178. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.01.003>
- Bopape, P. G., Wagenaar, C., Poka, M., & Bronkhorst, E. (2023). Vitamin D supplementation in a post-pandemic era: A narrative review. *South African Family Practice*, 65(1), 5752. <https://doi.org/10.4102/safp.v65i1.5752>
- Botting, R. A., Rana, H., Bertram, K. M., Rhodes, J. W., Baharlou, H., Nasr, N., Cunningham, A. L., & Harman, A. N. (2017). Langerhans cells and sexual transmission of HIV and HSV. *Reviews in Medical Virology*, 27(2). <https://doi.org/10.1002/rmv.1923>
- Boyerinas, B., Jochems, C., Fantini, M., Heery, C. R., Gulley, J. L., Tsang, K. Y., & Schlom, J. (2015). Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) activity of a novel anti-PD-L1 antibody avelumab (MSB0010718C) on human tumor cells. *Cancer immunology research*, 3(10), 1148-1157. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0059>
- Brancewicz, J., Wójcik, N., Sarnowska, Z., Robak, J., & Król, M. (2025). The Multifaceted Role of Macrophages in Biology and Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(5), 2107. <https://doi.org/10.3390/ijms26052107>
- Bui, L., Zhu, Z., Hawkins, S., Cortez-Resendiz, A., & Bellon, A. (2021). Vitamin D regulation of the immune system and its implications for COVID-19: A mini review. *SAGE Open Medicine*, 9, 20503121211014073. <https://doi.org/10.1177/20503121211014073>
- Bustin, S. A., Mueller, R., & Nolan, T. (2020). Parameters for Successful PCR Primer Design. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2065, 5-22. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9833-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9833-3_2)
- Cambau, E., & Drancourt, M. (2014). Steps towards the discovery of Mycobacterium tuberculosis by Robert Koch, 1882. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20(3), 196-201. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12555>
- Canene-Adams, K. (2013). General PCR. In *Methods in Enzymology* (Vol. 529, p. 291-298). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00024-0>
- Cara, G. (2025, février 26). Les macrophages, ces fins gourmets de l'immunité. *Salle de presse de l'Inserm*. <https://presse.inserm.fr/les-macrophages-ces-fins-gourmets-de-limmunitite/70086/>

- Carlini, V., Noonan, D. M., Abdalalem, E., Goletti, D., Sansone, C., Calabrone, L., & Albini, A. (2023). The multifaceted nature of IL-10 : Regulation, role in immunological homeostasis and its relevance to cancer, COVID-19 and post-COVID conditions. *Frontiers in Immunology*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1161067>
- Cendrowicz, E., Sas, Z., Bremer, E., & Rygiel, T. P. (2021). The Role of Macrophages in Cancer Development and Therapy. *Cancers*, *13*(8), 1946. <https://doi.org/10.3390/cancers13081946>
- Chahboune, M., Barkaoui, M., Iderdar, Y., Alwachami, N., Mourajid, Y., Ifleh, M., Boumendil, K., Bachar, K., & El Madani, S. (2022). Profil épidémiologique, aspects diagnostiques et évolutifs des patients tuberculeux au centre de diagnostic de la tuberculose et des maladies respiratoires de Settat, Maroc. *The Pan African Medical Journal*, *42*, 185. <https://doi.org/10.11604/pamj.2022.42.185.35250>
- Charoenngam, N., & Holick, M. F. (2020). Immunologic Effects of Vitamin D on Human Health and Disease. *Nutrients*, *12*(7), 2097. <https://doi.org/10.3390/nu12072097>
- Charoenngam, N., Shirvani, A., & Holick, M. F. (2019). Vitamin D for skeletal and non-skeletal health : What we should know. *Journal of Clinical Orthopaedics & Trauma*, *10*(6), 1082-1093. <https://doi.org/10.1016/j.jcot.2019.07.004>
- Chen, S., Saeed, A. F. U. H., Liu, Q., Jiang, Q., Xu, H., Xiao, G. G., Rao, L., & Duo, Y. (2023a). Macrophages in immunoregulation and therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *8*, 207. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01452-1>
- Combs, Jr., Gerald F., & McClung, J. P. (2022). Chapter 6—Vitamin D. In Jr. Combs Gerald F. & J. P. McClung (Éds.), *The Vitamins (Sixth Edition)* (p. 133-191). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90473-5.00001-X>
- Cronan, M. R. (2022). In the Thick of It : Formation of the Tuberculous Granuloma and Its Effects on Host and Therapeutic Responses. *Frontiers in Immunology*, *13*, 820134. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.820134>
- Czajka-Francuz, P., Prendes, M. J., Mankan, A., Quintana, Á., Pabla, S., Ramkissoon, S., Jensen, T. J., Peiró, S., Severson, E. A., Achyut, B. R., Vidal, L., Poelman, M., & Saini, K. S. (2023). Mechanisms of immune modulation in the tumor microenvironment and implications for targeted therapy. *Frontiers in Oncology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1200646>
- Das, A., Sinha, M., Datta, S., Abas, M., Chaffee, S., Sen, C. K., & Roy, S. (2015). Monocyte and Macrophage Plasticity in Tissue Repair and Regeneration. *The American Journal of Pathology*, *185*(10), 2596-2606. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.06.001>
- Delogu, G., Sali, M., & Fadda, G. (2013). The Biology of Mycobacterium Tuberculosis Infection. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, *5*(1), e2013070. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2013.070>

- DeLuca, H. F. (2014). History of the discovery of vitamin D and its active metabolites. *BoneKEY Reports*, 3, 479. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2013.213>
- Deng, J., Yang, Y., He, J., Xie, Z., Luo, F., Xu, J., & Zhang, Z. (2021). Vitamin D receptor activated by vitamin D administration alleviates Mycobacterium tuberculosis-induced bone destruction by inhibiting NFκB-mediated aberrant osteoclastogenesis. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 35(6), e21543. <https://doi.org/10.1096/fj.202100135R>
- Deng, L., Jian, Z., Xu, T., Li, F., Deng, H., Zhou, Y., Lai, S., Xu, Z., & Zhu, L. (2023). Macrophage Polarization: An Important Candidate Regulator for Lung Diseases. *Molecules*, 28(5), 2379. <https://doi.org/10.3390/molecules28052379>
- Dimitrov, V., & White, J. H. (2017). Vitamin D signaling in intestinal innate immunity and homeostasis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 453, 68-78. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.04.010>
- Din, R. U., Khan, M. I., Jan, A., Khan, S. A., & Ali, I. (2020). A novel approach for high-level expression and purification of GST-fused highly thermostable Taq DNA polymerase in Escherichia coli. *Archives of Microbiology*, 202(6), 1449-1458. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01860-9>
- Dupont, A., Mahaza, C., & Ataire-Marchais, V. (2020). Actualités sur la tuberculose. *Actualités Pharmaceutiques*, 59(593), 35-39. <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2019.12.015>
- Dyer, S. C., Austine-Orimoloye, O., Azov, A. G., Barba, M., Barnes, I., Barrera-Enriquez, V. P., Becker, A., Bennett, R., Beracochea, M., Berry, A., Bhai, J., Bhurji, S. K., Boddu, S., Branco Lins, P. R., Brooks, L., Ramaraju, S. B., Campbell, L. I., Martinez, M. C., Charkhchi, M., ... Yates, A. D. (2024). Ensembl 2025. *Nucleic Acids Research*, 53(D1), D948-D957. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1071>
- Ehlers, S. (2010). DC-SIGN and mannosylated surface structures of Mycobacterium tuberculosis : A deceptive liaison. *European Journal of Cell Biology*, 89(1), 95-101. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2009.10.004>
- El Baghdadi, J., Grant, A.-V., Sabri, A., El Azbaoui, S., Zaidi, H., Cobat, A., Schurr, E., Boisson-Dupuis, S., Casanova, J.-L., & Abel, L. (2013). Génétique humaine de la tuberculose. *Pathologie Biologie*, 61(1), 11-16. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2013.01.004>
- Esterle, L., Rothenbuhler, A., & Linglart, A. (2014). Rôle de la vitamine D et risque de maladies auto-immunes/cancers. *OCL*, 21(3), Article 3. <https://doi.org/10.1051/ocl/2013056>
- Fathi, N., Ahmadian, E., Shahi, S., Roshangar, L., Khan, H., Kouhsoltani, M., Maleki Dizaj, S., & Sharifi, S. (2019). Role of vitamin D and vitamin D receptor (VDR) in oral cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 391-401. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.102>

- Fenercioglu, A. K. (2024). The Anti-Inflammatory Roles of Vitamin D for Improving Human Health. *Current Issues in Molecular Biology*, 46(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/cimb46120807>
- Fiske, C. T., Blackman, A., Maruri, F., Rebeiro, P. F., Huaman, M., Kator, J., Scott Algood, H. M., & Sterling, T. R. (2019). Increased vitamin D receptor expression from macrophages after stimulation with M. tuberculosis among persons who have recovered from extrapulmonary tuberculosis. *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 366. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3958-7>
- Fitriana, N., Iswanti, F. C., & Sadikin, M. (2024). The Role of Hypoxia-inducible Factor in Mycobacterium tuberculosis-infected Macrophages. *Molecular and Cellular Biomedical Sciences*, 8(1), 23. <https://doi.org/10.21705/mcbs.v8i1.405>
- Funes, S. C., Rios, M., Escobar-Vera, J., & Kalergis, A. M. (2018). Implications of macrophage polarization in autoimmunity. *Immunology*, 154(2), 186-195. <https://doi.org/10.1111/imm.12910>
- Gaidt, M. M., Rapino, F., Graf, T., & Hornung, V. (2018). Modeling Primary Human Monocytes with the Trans-Differentiation Cell Line BLaER1. In D. De Nardo & C. M. De Nardo (Éds.), *Innate Immune Activation* (Vol. 1714, p. 57-66). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7519-8\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7519-8_4)
- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013a). Research Techniques Made Simple : Polymerase Chain Reaction (PCR). *The Journal of investigative dermatology*, 133(3), e6. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013b). Research Techniques Made Simple : Polymerase Chain Reaction (PCR). *The Journal of investigative dermatology*, 133(3), e6. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- Ghaseminejad-Raeini, A., Ghaderi, A., Sharafi, A., Nematollahi-Sani, B., Moossavi, M., Derakhshani, A., & Sarab, G. A. (2023a). Immunomodulatory actions of vitamin D in various immune-related disorders : A comprehensive review. *Frontiers in Immunology*, 14, 950465. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.950465>
- Ghaseminejad-Raeini, A., Ghaderi, A., Sharafi, A., Nematollahi-Sani, B., Moossavi, M., Derakhshani, A., & Sarab, G. A. (2023b). Immunomodulatory actions of vitamin D in various immune-related disorders : A comprehensive review. *Frontiers in Immunology*, 14, 950465. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.950465>
- Gordon, S. V., & Parish, T. (2018). Microbe Profile : Mycobacterium tuberculosis: Humanity's deadly microbial foe: This article is part of the Microbe Profiles collection. *Microbiology*, 164(4), 437-439. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000601>

- Guillot, X., Semerano, L., Saidenberg-Kermanac'h, N., Falgarone, G., & Boissier, M.-C. (2011). Vitamine D et inflammation. *Revue du Rhumatisme*, 78(2), 128-133. <https://doi.org/10.1016/j.rhum.2010.09.007>
- Guirado, E., Schlesinger, L. S., & Kaplan, G. (2013). Macrophages in Tuberculosis : Friend or Foe. *Seminars in immunopathology*, 35(5), 563-583. <https://doi.org/10.1007/s00281-013-0388-2>
- He, C., & Carter, A. B. (2015). The Metabolic Prospective and Redox Regulation of Macrophage Polarization. *Journal of clinical & cellular immunology*, 6(6), 371. <https://doi.org/10.4172/2155-9899.1000371>
- Herb, M., Schatz, V., Hadrian, K., Hos, D., Holoborodko, B., Jantsch, J., & Brigo, N. (2024a). Macrophage variants in laboratory research : Most are well done, but some are RAW. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14, 1457323. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1457323>
- Hoeffel, G., & Ginhoux, F. (2015). Ontogeny of Tissue-Resident Macrophages. *Frontiers in Immunology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00486>
- Hourani, T., Perez-Gonzalez, A., Khoshmanesh, K., Luwor, R., Achuthan, A. A., Baratchi, S., O'Brien-Simpson, N. M., & Al-Hourani, A. (2022). *Label-free Macrophage Phenotype Classification Using Machine Learning Methods*. In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2147643/v1>
- Iruretagoyena, M., Hirigoyen, D., Naves, R., & Burgos, P. I. (2015). Immune Response Modulation by Vitamin D : Role in Systemic Lupus Erythematosus. *Frontiers in Immunology*, 6, 513. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00513>
- Ishino, S., & Ishino, Y. (2014). DNA polymerases as useful reagents for biotechnology - the history of developmental research in the field. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00465>
- Jarrett, P., & Scragg, R. (2017). A short history of phototherapy, vitamin D and skin disease. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 16(3), 283-290. <https://doi.org/10.1039/C6PP00406G>
- Jayaraman, A., Walachowski, S., & Bosmann, M. (2024). The complement system : A key player in the host response to infections. *European Journal of Immunology*, 54(11), 2350814. <https://doi.org/10.1002/eji.202350814>
- Jones, G. (2018). The discovery and synthesis of the nutritional factor vitamin D. *International Journal of Paleopathology*, 23, 96-99. <https://doi.org/10.1016/j.ijpp.2018.01.002>
- Jones, G. (2022). 100 YEARS OF VITAMIN D : Historical aspects of vitamin D. *Endocrine Connections*, 11(4), e210594. <https://doi.org/10.1530/EC-21-0594>

- Kalendar, R., Khassenov, B., Ramankulov, Y., Samuilova, O., & Ivanov, K. I. (2017). FastPCR : An in silico tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis. *Genomics*, *109*(3-4), 312-319. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.05.005>
- Kalendar, R., Shevtsov, A., Otarbay, Z., & Ismailova, A. (2024). In silico PCR analysis : A comprehensive bioinformatics tool for enhancing nucleic acid amplification assays. *Frontiers in Bioinformatics*, *4*, 1464197. <https://doi.org/10.3389/fbinf.2024.1464197>
- Kee, P. S., Karunanathie, H., Maggo, S. D. S., Kennedy, M. A., & Chua, E. W. (2023). Long-Range Polymerase Chain Reaction. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *2967*, 181-192. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3358-8\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3358-8_15)
- Kerkis, I., da Silva, Á. P., & Araldi, R. P. (2024). The impact of interleukin-6 (IL-6) and mesenchymal stem cell-derived IL-6 on neurological conditions. *Frontiers in Immunology*, *15*, 1400533. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1400533>
- Khehra, N., Padda, I. S., & Swift, C. J. (2025a). Polymerase Chain Reaction (PCR). In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/>
- Kiazyk, S., & Ball, T. (2017). Latent tuberculosis infection : An overview. *Canada Communicable Disease Report*, *43*(3-4), 62-66.
- Kim, D.-H., Meza, C. A., Clarke, H., Kim, J.-S., & Hickner, R. C. (2020). Vitamin D and Endothelial Function. *Nutrients*, *12*(2), 575. <https://doi.org/10.3390/nu12020575>
- Kotliarova, M. S., Shumkov, M. S., & Goncharenko, A. V. (2025). Toward Mycobacterium tuberculosis Virulence Inhibition : Beyond Cell Wall. *Microorganisms*, *13*(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13010021>
- L Bishop, E., Ismailova, A., Dimeloe, S., Hewison, M., & White, J. H. (2020). Vitamin D and Immune Regulation : Antibacterial, Antiviral, Anti-Inflammatory. *JBMR Plus*, *5*(1), e10405. <https://doi.org/10.1002/jbm4.10405>
- Lagishetty, V., Liu, N. Q., & Hewison, M. (2011). Vitamin D metabolism and innate immunity. *Molecular and cellular endocrinology*, *347*(1-2), 97-105. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.04.015>
- Landrier, J.-F. (2014a). Vitamine D : Sources, métabolisme et mécanismes d'action. *OCL*, *21*(3), D302. <https://doi.org/10.1051/ocl/2014001>
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., Kim, Y. H., Lee, P. Y., & Costumbrado, J. (2012). Électrophorèse sur gel d'agarose pour la séparation de fragments d'ADN. *Journal of Visualized Experiments (JoVE)*, *62*, e3923. <https://doi.org/10.3791/3923>
- Li, M., Li, Y., Lu, Y., Li, J., Lu, X., Ren, Y., Wen, T., Wang, Y., Chang, S., Zhang, X., Yang, X., & Shen, Y. (2023). Molecular basis of Mg<sup>2+</sup> permeation through the human mitochondrial Mrs2 channel. *Nature Communications*, *14*, 4713. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40516-2>

- Liu, Y., Wang, Y., Yang, Y., Weng, L., Wu, Q., Zhang, J., Zhao, P., Fang, L., Shi, Y., & Wang, P. (2023). Emerging phagocytosis checkpoints in cancer immunotherapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8, 104. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01365-z>
- Maertzdorf, J., Tönnies, M., Lozza, L., Schommer-Leitner, S., Mollenkopf, H., Bauer, T. T., & Kaufmann, S. H. E. (2018). Mycobacterium tuberculosis Invasion of the Human Lung : First Contact. *Frontiers in Immunology*, 9, 1346. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01346>
- Magnani, M., Crinelli, R., Bianchi, M., & Antonelli, A. (2000). The Ubiquitin-Dependent Proteolytic System and other Potential Targets for the Modulation of Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). *Current Drug Targets*, 1(4), 387-399. <https://doi.org/10.2174/1389450003349056>
- Mandlik, R., Ladkat, D., & Khadilkar, A. (2023). Contribution of Vitamin D Metabolites to Vitamin D Concentrations of Families Residing in Pune City. *Nutrients*, 15(8), 2003. <https://doi.org/10.3390/nu15082003>
- McDonald, C., Taylor, D., & Linacre, A. (2024). PCR in Forensic Science : A Critical Review. *Genes*, 15(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/genes15040438>
- Misombo-Kalabela, A., Nguéfack-Tsague, G., Kalla, G. C. M., Ze, E. A., Diangs, K., Panda, T., Kebela, I., Fueza, S. B., Magazani, N., & Mbopi-Kéou, F.-X. (2016). Facteurs de risque de la tuberculose multi-résistante dans la ville de Kinshasa en République Démocratique du Congo. *The Pan African Medical Journal*, 23, 157. <https://doi.org/10.11604/pamj.2016.23.157.6137>
- Mitchell, S., Vargas, J., & Hoffmann, A. (2016). Signaling via the NF $\kappa$ B system. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine*, 8(3), 227-241. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1331>
- Mohammadnabi, N., Shamseddin, J., Emadi, M., Bodaghi, A. B., Varseh, M., Shariati, A., Rezaei, M., Dastranj, M., & Farahani, A. (2024). Mycobacterium tuberculosis : The Mechanism of Pathogenicity, Immune Responses, and Diagnostic Challenges. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 38(23), e25122. <https://doi.org/10.1002/jcla.25122>
- Mohr, S. B. (2009). A brief history of vitamin d and cancer prevention. *Annals of Epidemiology*, 19(2), 79-83. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2008.10.003>
- Monnier, M., Paolini, L., Vinatier, E., Mantovani, A., Delneste, Y., & Jeannin, P. (2022). Antitumor strategies targeting macrophages : The importance of considering the differences in differentiation/polarization processes between human and mouse macrophages. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 10(10), e005560. <https://doi.org/10.1136/jitc-2022-005560>

- Mori, T., Horibe, K., Koide, M., Uehara, S., Yamamoto, Y., Kato, S., Yasuda, H., Takahashi, N., Udagawa, N., & Nakamichi, Y. (2020). The Vitamin D Receptor in Osteoblast-Lineage Cells Is Essential for the Proresorptive Activity of  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  In Vivo. *Endocrinology*, 161(11), bqaa178. <https://doi.org/10.1210/endo/bqaa178>
- Moridi, I., Chen, A., Tal, O., & Tal, R. (2020). The Association between Vitamin D and Anti-Müllerian Hormone : A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, 12(6), 1567. <https://doi.org/10.3390/nu12061567>
- Naik, M., Kamath U, S., Uppangala, S., Adiga, S. K., & Patil, A. (2023). Vitamin D metabolites and analytical challenges. *Analytical Methods: Advancing Methods and Applications*, 15(4), 399-410. <https://doi.org/10.1039/d2ay01692c>
- Nair, A., Greeny, A., Nandan, A., Sah, R. K., Jose, A., Dyawanapelly, S., Junnuthula, V., K. V., A., & Sadanandan, P. (2023). Advanced drug delivery and therapeutic strategies for tuberculosis treatment. *Journal of Nanobiotechnology*, 21, 414. <https://doi.org/10.1186/s12951-023-02156-y>
- Nassar, L. R., Barber, G. P., Benet-Pagès, A., Casper, J., Clawson, H., Diekhans, M., Fischer, C., Gonzalez, J. N., Hinrichs, A. S., Lee, B. T., Lee, C. M., Muthuraman, P., Nguy, B., Pereira, T., Nejad, P., Perez, G., Raney, B. J., Schmelter, D., Speir, M. L., ... Kent, W. J. (2022). The UCSC Genome Browser database : 2023 update. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D1188-D1195. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1072>
- Natarajan, A., Beena, P. M., Devnikar, A. V., & Mali, S. (2020). A systemic review on tuberculosis. *The Indian Journal of Tuberculosis*, 67(3), 295-311. <https://doi.org/10.1016/j.ijtb.2020.02.005>
- Nguyen, H., Gazy, N., & Venketaraman, V. (2020). A Role of Intracellular Toll-Like Receptors (3, 7, and 9) in Response to Mycobacterium tuberculosis and Co-Infection with HIV. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), Article 17. <https://doi.org/10.3390/ijms21176148>
- Nguyen, T. K. T., d'Aigle, J., Chinae, L., Niaz, Z., Hunter, R. L., Hwang, S.-A., & Actor, J. K. (2020). Mycobacterial Trehalose 6,6'-Dimycolate-Induced M1-Type Inflammation. *The American Journal of Pathology*, 190(2), 286-294. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2019.10.006>
- Ni, R., Jiang, L., Zhang, C., Liu, M., Luo, Y., Hu, Z., Mou, X., & Zhu, Y. (2023). Biologic Mechanisms of Macrophage Phenotypes Responding to Infection and the Novel Therapies to Moderate Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(9), 8358. <https://doi.org/10.3390/ijms24098358>
- Norman, A. W. (2012a). The History of the Discovery of Vitamin D and Its Daughter Steroid Hormone. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61(3), 199-206. <https://doi.org/10.1159/000343104>

- Oda, Y., Hu, L., Nguyen, T., Fong, C., Zhang, J., Guo, P., & Bikle, D. D. (2018). Vitamin D Receptor Is Required for Proliferation, Migration, and Differentiation of Epidermal Stem Cells and Progeny During Cutaneous Wound Repair. *The Journal of investigative dermatology*, 138(11), 2423-2431. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.04.033>
- Ostrik, A. A., Azhikina, T. L., & Salina, E. G. (2021). Small Noncoding RNAs and Their Role in the Pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis Infection. *Biochemistry. Biokhimiia*, 86(Suppl 1), S109-S119. <https://doi.org/10.1134/S000629792114008X>
- Pai, M., Behr, M. A., Dowdy, D., Dheda, K., Divangahi, M., Boehme, C. C., Ginsberg, A., Swaminathan, S., Spigelman, M., Getahun, H., Menzies, D., & Raviglione, M. (2016). Tuberculosis. *Nature Reviews. Disease Primers*, 2, 16076. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.76>
- Pajuelo, D., Gonzalez-Juarbe, N., Tak, U., Sun, J., Orihuela, C. J., & Niederweis, M. (2018). NAD<sup>+</sup> Depletion Triggers Macrophage Necroptosis, a Cell Death Pathway Exploited by Mycobacterium tuberculosis. *Cell Reports*, 24(2), 429-440. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.042>
- Pan, Y., Yu, Y., Wang, X., & Zhang, T. (2020). Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. *Frontiers in Immunology*, 11, 583084. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.583084>
- Peng, Y., Zhou, M., Yang, H., Qu, R., Qiu, Y., Hao, J., Bi, H., & Guo, D. (2023). Regulatory Mechanism of M1/M2 Macrophage Polarization in the Development of Autoimmune Diseases. *Mediators of Inflammation*, 2023, 8821610. <https://doi.org/10.1155/2023/8821610>
- Pérez, S., & Rius-Pérez, S. (2022). Macrophage Polarization and Reprogramming in Acute Inflammation : A Redox Perspective. *Antioxidants*, 11(7), 1394. <https://doi.org/10.3390/antiox11071394>
- Piraux, A. (2021). Vitamine D et Covid-19. *Actualités Pharmaceutiques*, 60(605), 52-55. <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2021.02.012>
- Pop, T. L., Sîrbe, C., Bența, G., Mititelu, A., & Grama, A. (2022a). The Role of Vitamin D and Vitamin D Binding Protein in Chronic Liver Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), 10705. <https://doi.org/10.3390/ijms231810705>
- Pu, Y., & Ji, Q. (2022). Tumor-Associated Macrophages Regulate PD-1/PD-L1 Immunosuppression. *Frontiers in Immunology*, 13, 874589. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.874589>
- Puri, R. V., Reddy, P. V., & Tyagi, A. K. (2013). Secreted Acid Phosphatase (SapM) of Mycobacterium tuberculosis Is Indispensable for Arresting Phagosomal Maturation and Growth of the Pathogen in Guinea Pig Tissues. *PLoS ONE*, 8(7), e70514. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070514>

- Rahlwes, K. C., Dias, B. R. S., Campos, P. C., Alvarez-Arguedas, S., & Shiloh, M. U. (s. d.). Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Virulence*, 14(1), 2150449. <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2150449>
- Ramon-Luing, L. A., Palacios, Y., Ruiz, A., Téllez-Navarrete, N. A., & Chavez-Galan, L. (2023). Virulence Factors of *Mycobacterium tuberculosis* as Modulators of Cell Death Mechanisms. *Pathogens*, 12(6), 839. <https://doi.org/10.3390/pathogens12060839>
- Ryndak, M. B., & Laal, S. (2019). *Mycobacterium tuberculosis* Primary Infection and Dissemination : A Critical Role for Alveolar Epithelial Cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 299. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00299>
- Sancha Dominguez, L., Cotos Suárez, A., Sánchez Ledesma, M., & Muñoz Bellido, J. L. (2024). Present and Future Applications of Digital PCR in Infectious Diseases Diagnosis. *Diagnostics*, 14(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/diagnostics14090931>
- Sankar, P., & Mishra, B. B. (2023). Early innate cell interactions with *Mycobacterium tuberculosis* in protection and pathology of tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, 14, 1260859. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1260859>
- Saponaro, F., Saba, A., & Zucchi, R. (2020). An Update on Vitamin D Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), Article 18. <https://doi.org/10.3390/ijms21186573>
- Sayers, E. W., Bolton, E. E., Brister, J. R., Canese, K., Chan, J., Comeau, D. C., Connor, R., Funk, K., Kelly, C., Kim, S., Madej, T., Marchler-Bauer, A., Lanczycki, C., Lathrop, S., Lu, Z., Thibaud-Nissen, F., Murphy, T., Phan, L., Skripchenko, Y., ... Sherry, S. T. (2021). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D20-D26. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1112>
- Schlienger, J. L., & Monnier, L. (2019). Histoire de la vitamine D, une centenaire à laquelle on prête peut-être davantage qu'elle ne peut tenir. *Médecine des Maladies Métaboliques*, 13(4), 375-383. [https://doi.org/10.1016/S1957-2557\(19\)30106-3](https://doi.org/10.1016/S1957-2557(19)30106-3)
- Septiyanto, A. F., Cahyono, Y. F. C., Sarno, R., Taufany, F., Larekeng, S. H., Sungkono, K. R., Syahrudin, K., Lestari, E. G., & Sholiq. (2022). An Improved Method for Prioritizing Polymerase Chain Reaction (PCR) Primer Design in Sanger Sequencing. *2022 6th International Conference on Information Technology, Information Systems and Electrical Engineering (ICITISEE)*, 443-448. <https://doi.org/10.1109/ICITISEE57756.2022.10057821>
- Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S.-A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J. T., & Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*, 233(9), 6425-6440. <https://doi.org/10.1002/jcp.26429>

- Sia, J. K., Georgieva, M., & Rengarajan, J. (2015). Innate Immune Defenses in Human Tuberculosis : An Overview of the Interactions between Mycobacterium tuberculosis and Innate Immune Cells. *Journal of Immunology Research*, 2015, 747543. <https://doi.org/10.1155/2015/747543>
- Slater, G. W., Desruisseaux, C., Hubert, S. J., Mercier, J. F., Labrie, J., Boileau, J., Tessier, F., & Pépin, M. P. (2000). Theory of DNA electrophoresis : A look at some current challenges. *Electrophoresis*, 21(18), 3873-3887. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200012\)21:18<3873::AID-ELPS3873>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200012)21:18<3873::AID-ELPS3873>3.0.CO;2-8)
- Sparaco, M., & Bonavita, S. (2024). Vitamin D Supplementation : Effect on Cytokine Profile in Multiple Sclerosis. *Journal of Clinical Medicine*, 13(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/jcm13030835>
- Sr, K. (2015). *PCR Technique with its Application*. 4(1).
- Sreejit, G., Fleetwood, A. J., Murphy, A. J., & Nagareddy, P. R. (2020a). Origins and diversity of macrophages in health and disease. *Clinical & Translational Immunology*, 9(12), e1222. <https://doi.org/10.1002/cti2.1222>
- Staff, B. T. B. (2019, septembre 25). *PCR Primer Design Tips*. Behind the Bench. <https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/pcr-primer-design-tips/>
- Strizova, Z., Benesova, I., Bartolini, R., Novysedlak, R., Cecdlova, E., Foley, L. K., & Striz, I. (2023). M1/M2 macrophages and their overlaps – myth or reality? *Clinical Science (London, England : 1979)*, 137(15), 1067-1093. <https://doi.org/10.1042/CS20220531>
- Tabas, I., & Bornfeldt, K. E. (2016). Macrophage Phenotype and Function in Different Stages of Atherosclerosis. *Circulation research*, 118(4), 653-667. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306256>
- Taqarort, N., & Chadli, S. (2020). Vitamine D et risque des infections respiratoires aiguës : Grippe et COVID-19. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 34(3), 211-215. <https://doi.org/10.1016/j.nupar.2020.05.003>
- Thornton, B., & Basu, C. (2011). Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 39(2), 145-154. <https://doi.org/10.1002/bmb.20461>
- Tissandié, E., Guéguen, Y., A.Lobaccaro, J.-M., Aigueperse, J., & Souidi, M. (2006). Vitamine D : Métabolisme, régulation et maladies associées. *médecine/sciences*, 22(12), Article 12. <https://doi.org/10.1051/medsci/200622121095>
- Toledo, B., Zhu Chen, L., Paniagua-Sancho, M., Marchal, J. A., Perán, M., & Giovannetti, E. (2024). Deciphering the performance of macrophages in tumour microenvironment : A call for precision immunotherapy. *Journal of Hematology & Oncology*, 17, 44. <https://doi.org/10.1186/s13045-024-01559-0>

- Ufimtseva, E. G., Ereemeeva, N. I., Umpeleva, T. V., Vakhrusheva, D. V., & Skornyakov, S. N. (2021). Mycobacterium tuberculosis Load in Host Cells and the Antibacterial Activity of Alveolar Macrophages Are Linked and Differentially Regulated in Various Lung Lesions of Patients with Pulmonary Tuberculosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3452. <https://doi.org/10.3390/ijms22073452>
- Umar, M., Sastry, K. S., & Chouchane, A. I. (2018). Role of Vitamin D Beyond the Skeletal Function : A Review of the Molecular and Clinical Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), 1618. <https://doi.org/10.3390/ijms19061618>
- Usategui-Martín, R., De Luis-Román, D.-A., Fernández-Gómez, J. M., Ruiz-Mambrilla, M., & Pérez-Castrillón, J.-L. (2022). Vitamin D Receptor (VDR) Gene Polymorphisms Modify the Response to Vitamin D Supplementation : A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, 14(2), 360. <https://doi.org/10.3390/nu14020360>
- Vajpayee, K., Dash, H. R., Parekh, P. B., & Shukla, R. K. (2023). PCR inhibitors and facilitators – Their role in forensic DNA analysis. *Forensic Science International*, 349, 111773. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2023.111773>
- Velmurugan, K., Chen, B., Miller, J. L., Azogue, S., Gurses, S., Hsu, T., Glickman, M., Jacobs, W. R., Porcelli, S. A., & Briken, V. (2007). Mycobacterium tuberculosis nuoG Is a Virulence Gene That Inhibits Apoptosis of Infected Host Cells. *PLoS Pathogens*, 3(7), e110. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030110>
- Vergne, I., Gilleron, M., & Nigou, J. (2015). Manipulation of the endocytic pathway and phagocyte functions by Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00187>
- Verma, N., & Saraf, S. (2017). A ROLE OF MACROPHAGES : AN OVERVIEW. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 7(6), 91-103. <https://doi.org/10.22270/jddt.v7i6.1521>
- Voltan, G., Cannito, M., Ferrarese, M., Ceccato, F., & Camozzi, V. (2023). Vitamin D : An Overview of Gene Regulation, Ranging from Metabolism to Genomic Effects. *Genes*, 14(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/genes14091691>
- Wang, X.-L., Wang, X., & Ho, W.-Z. (2024). Roles of Macrophages in Viral Infections. *Viruses*, 16(10), 1643. <https://doi.org/10.3390/v16101643>
- Wang, Y., Zhu, J., & DeLuca, H. F. (2012). Where is the vitamin D receptor? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 523(1), 123-133. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.04.001>
- Wittmeier, P., & Hummel, S. (2022). Agarose Gel Electrophoresis to Assess PCR Product Yield : Comparison with Spectrophotometry, Fluorometry and qPCR. *BioTechniques*, 72(4), 155-158. <https://doi.org/10.2144/btn-2021-0094>
- Wolf, A. J., Linas, B., Trevejo-Nuñez, G. J., Kincaid, E., Tamura, T., Takatsu, K., & Ernst, J. D. (2007). Mycobacterium tuberculosis infects dendritic cells with high frequency and

- impairs their function in vivo. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 179(4), 2509-2519. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.4.2509>
- Wong, D., Bach, H., Sun, J., Hmama, Z., & Av-Gay, Y. (2011). Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H<sup>+</sup>-ATPase to inhibit phagosome acidification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(48), 19371-19376. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109201108>
- Wu, M.-Y., & Lu, J.-H. (2020). Autophagy and Macrophage Functions : Inflammatory Response and Phagocytosis. *Cells*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/cells9010070>
- Yan, W., Zheng, Y., Dou, C., Zhang, G., Arnaout, T., & Cheng, W. (2022). The pathogenic mechanism of Mycobacterium tuberculosis: Implication for new drug development. *Molecular Biomedicine*, 3, 48. <https://doi.org/10.1186/s43556-022-00106-y>
- Yang, S., Zhao, M., & Jia, S. (2023). Macrophage: Key player in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Frontiers in Immunology*, 14, 1080310. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1080310>
- Zajac, I. T., Barnes, M., Cavuoto, P., Wittert, G., & Noakes, M. (2020). The Effects of Vitamin D-Enriched Mushrooms and Vitamin D3 on Cognitive Performance and Mood in Healthy Elderly Adults: A Randomised, Double-Blinded, Placebo-Controlled Trial. *Nutrients*, 12(12), 3847. <https://doi.org/10.3390/nu12123847>
- Zhang, H., Liu, L., Liu, J., Dang, P., Hu, S., Yuan, W., Sun, Z., Liu, Y., & Wang, C. (2023). Roles of tumor-associated macrophages in anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy for solid cancers. *Molecular Cancer*, 22, 58. <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01725-x>
- Zhao, Y., Zhao, S., Liu, S., Ye, W., & Chen, W.-D. (2025). Kupffer cells, the limelight in the liver regeneration. *International Immunopharmacology*, 146, 113808. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2024.113808>
- Zhuang, L., Yang, L., Li, L., Ye, Z., & Gong, W. (2024). Mycobacterium tuberculosis: Immune response, biomarkers, and therapeutic intervention. *MedComm*, 5(1), e419. <https://doi.org/10.1002/mco2.419>

## Résumé

**Introduction :** *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), une bactérie à Gram positif intracellulaire, responsable de la tuberculose chez l'être humain, cible essentiellement les macrophages. Ces cellules le facteur de transcription *NF-κB*, qui contrôle la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine 6 (*IL6*). Par ailleurs, la vitamine D améliore la réponse immunitaire en stimulant la production de peptides antimicrobiens comme la cathélicidine et en régulant l'activité de *NF-κB* et d'*IL6*.

**Objectif :** L'objectif de ce travail est de concevoir des amorces spécifiques aux gènes *IL6* et *NFKB1* exprimés par le macrophage afin de quantifier par PCR leur expression lors de l'infection par *M. tuberculosis*.

**Matériel et méthodes :** Une analyse bio-informatique a été menée afin d'identifier la séquence du gène *IL6* et *NFKB1* à partir de la base de données disponible sur le site ensembl.org. Ensuite, l'outil Primer-BLAST de la plateforme NCBI a été utilisé pour concevoir une paire d'amorce optimales. La spécificité de ces amorces a été validée par une analyse PCR *in silico*.

**Résultats :** À l'aide de l'outil Primer-BLAST, des amorces spécifiques ciblant le gène *IL6* et *NFKB1* ont été conçues.

Pour le gène *IL6*, les séquences d'amorces retenues sont : l'amorce sens "AGAGGACCACCGTCTCTGTT" et l'amorce antisens "GTCTCCAGGTGGAGTGTGTG", générant un amplicon de 867 pb. Les températures de fusion ( $T_m$ ) associées sont respectivement de 59,32 °C pour l'amorce sens et 60,18 °C pour l'amorce antisens. Chaque amorce a une longueur de 20 nucléotides et une composition en bases GC de 55 %.

Concernant le gène *NFKB1* les amorces sélectionnées sont : "TTGCCTCTTACCACACAGA" (amorce sens) et "GGCAGCAGAGGGATGTTTCT" (amorce antisens), permettant l'amplification d'un fragment de 739 pb. Les températures de fusion sont de 59,16 °C pour l'amorce sens et 60,03 °C pour l'amorce antisens. Ces amorces possèdent aussi une longueur de 20 nucléotides, affichant un pourcentage de GC de 50 % pour l'amorce sens et de 55 % pour l'antisens.

**Conclusion :** Le choix minutieux des amorces pour la PCR ciblant les gènes *IL6* et *NFKB1* est essentiel pour garantir le succès de l'expérimentation et enrichir notre connaissance de leur rôle dans la réaction immunitaire aux infections.

**Mots clé:** *Mycobacterium tuberculosis*, Macrophage, *IL6*, *NF-κB*, Primer-blast, amorce

## Abstract

**Introduction:** *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), an intracellular Gram-positive bacterium responsible for tuberculosis in humans, primarily targets macrophages. These cells contain the transcription factor *NF-κB*, which controls the production of pro-inflammatory cytokines such as interleukin 6 (*IL6*). Furthermore, vitamin D enhances the immune response by promoting the production of antimicrobial peptides like cathelicidin and by regulating the activity of *NF-κB* and *IL6*.

**Objective:** The objective of this study is to design specific primers for *IL6* and *NFKB1* genes, expressed in macrophages, to quantify their expression by PCR during *M. tuberculosis* infection.

**Materials and Methods :** A bioinformatics analysis was conducted to identify the sequences of the *IL6* and *NFKB1* genes from the database available on the Ensembl website ensembl.org. Subsequently, the Primer-BLAST tool on the NCBI platform was used to design an optimal primer pair. The specificity of these primers was validated by *in silico* PCR analysis.

**Results:** Using the Primer-BLAST tool, specific primers targeting *IL6* and *NFKB1* genes were designed.

For the *IL6* gene, the selected primer sequences are the forward primer "AGAGGACCACCGTCTCTGTT" and the reverse primer "GTCTCCAGGTGGAGTGTGTG", generating an 867 bp amplicon. The respective melting temperatures ( $T_m$ ) are 59.32°C for the forward primer and 60.18°C for the reverse primer. Each primer is 20 nucleotides long with a GC content of 55%.

For the *NFKB1* gene, the selected primers are: "TTGCCTCTTACCACACAGA" (forward primer) and "GGCAGCAGAGGGATGTTTCT" (reverse primer), which amplify a 739 bp fragment. The melting temperatures are 59.16°C for the forward primer and 60.03°C for the reverse primer. These primers are also 20 nucleotides long, with a GC content of 50% for the forward primer and 55% for the reverse primer.

**Conclusion:** The careful selection of primers for PCR targeting the *IL6* and *NFKB1* genes is essential to ensure the success of the experiment and to enrich our knowledge of their role in the immune response to infections

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, Macrophage, *IL6*, *NF-κB*, Primer-blast, primer.

## المخلص

**المقدمة:** المتطفرة السلية (*Mtb*)، وهي بكتيريا داخل خلوية موجبة الجرام مسؤولة عن مرض السل لدى البشر، تستهدف بشكل رئيسي الخلايا البلعمية. تعتمد هذه الخلايا على عامل النسخ عامل النسخ *NF-κB*، الذي يتحكم في إنتاج السيتوكينات المسببة للالتهابات مثل الإنترلوكين 6 (*IL6*). علاوة على ذلك، يُعزز فيتامين د الاستجابة المناعية من خلال تحفيز إنتاج الببتيدات المضادة للميكروبات مثل الكاتاليسيدين، وتنظيم نشاط *NF-κB* و *IL6*.

**الهدف:** من هذا العمل هو تصميم بادئات خاصة بجينات *IL6* و *NFKB1* التي يعبر عنها البلاعم من أجل تحديد كمية التعبير عنها بواسطة تفاعل البوليميراز المتسلسل أثناء الإصابة بمرض السل. **المواد والطرق:** أجري تحليل معلوماتي حيوي لتحديد تسلسل جينات *IL6* و *NFKB1* من قاعدة البيانات المتاحة على الموقع الإلكتروني ensembl.org بعد ذلك، استخدمت أداة Primer-BLAST من منصة NCBI لتصميم زوج بادئات مثالي. وتم التحقق من دقة هذه البادئات من خلال تحليل تفاعل البوليميراز المتسلسل الحاسوبي (*in silico* PCR).

**النتائج:** باستخدام أداة Primer-BLAST، صُممت بادئات محددة تستهدف جينات *IL6* و *NFKB1*. بالنسبة لجين *IL6*، تسلسلات البادئات المختارة هي: البادئ الأمامي "AGAGGACCACCGTCTCTGTT" والبادئ العكسي "GTCTCCAGGTGGAGTGTGTG"، مما يُنتج أمبليكون بطول 867 زوجًا قاعدًا. درجات حرارة الانصهار ( $T_m$ ) للبادئ الأمامي هي 59.32 درجة مئوية و 60.18 درجة مئوية للبادئ العكسي. يتكون كل بادئ من 20 نيوكليوتيدًا، ومحتوى GC بنسبة 55%. بالنسبة لجين *NFKB1*، البادئات المختارة هي: "TTGCCTCTTACCACACAGA" (البادئ الأمامي) و "GGCAGCAGAGGGATGTTTCT" (البادئ العكسي)، مما يُضخّم جزءًا بطول 739 زوجًا قاعدًا. تبلغ درجات انصهار البادئ الأمامي 59.16 درجة مئوية، بينما تبلغ درجة انصهار البادئ العكسي 60.03 درجة مئوية. يتكون هذان البادئان أيضًا من 20 نيوكليوتيدًا، ومحتوى كروماتوغرافيا كربونية 50% للبادئ الأمامي و 55% للبادئ العكسي.

**الاستنتاج:** إن الاختيار الدقيق للبادئات لتفاعل البوليميراز المتسلسل لجينات *IL6* و *NFKB1* هو خطوة أساسية لضمان نجاح التجربة وفهم دورها في الدفاع المناعي ضد العدوى بشكل أفضل.

**الكلمات المفتاحية:** المتطفرة السلية، الخلايا البلعمية، *NF-κB*، *IL6* برايمر بلاست، مواد أولية



