



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ ABOU BEKR BELKAID-TLEMCE



Faculté de Science de la Nature et de la Vie et Science de la Terre et l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliqué et de l'Immunologie W04144100

MEMOIRE

Présenté par

BRAHIMI Fatima Zohra

AISSAOUIA Meryem

En vue de l'option du

Diplôme de MASTER

En Immunologie

Thème :

Conception des amorces pour les gènes *CYP27B1* et *VDR* exprimés par le macrophage dans le but d'étudier 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*) est une bactérie à Gram positif, pathogène intracellulaire responsable de la tuberculose chez l'homme. Le macrophage est une cellule clé de système immunitaire qui permet de détruire ce pathogène. Cette destruction peut être favorisée par la vitamine D qui stimule l'expression des gènes *CYP27B1* et *VDR* qui sont impliqués dans la production des peptides antimicrobiens.

Objectif : Conception d'amorces encadrants les gènes *CYP27B1* et *VDR* exprimés par le macrophage afin d'étudier leur expression par le macrophage au cours de l'infection par *M. tuberculosis*.

Matériel et méthodes : Afin de concevoir des amorces spécifiques des gènes *CYP27B1* et *VDR*, on a utilisé plusieurs outils : la base de données ensemble.org, pour trouver de séquence spécifique des gènes étudiés et un outil de primer-BLAST fourni par le NCBI pour concevoir des amorces. Les résultats sont confirmés par une PCR *in silico*.

Résultats : L'utilisation de l'outil Primer-BLAST a permis d'obtenir une amorce spécifique au gène *CYP27B1* (paire 6) à savoir : F primer TCCCGACTCTTAGCAGAGGG, R primer AGGATAAGGAGGTAGGCGGG avec un produit spécifique de 866 pb, Tm (F primer 60,40°C, R primer : 60,18°C), la teneur en GC est 60% pour l'amorce sens et anti-sens et une longueur de 20 nucléotides pour les deux amorces. Pour le gène *VDR*, on a trouvé deux paires, la paire 6, F primer TTCATGCCTCTCTGGCAGTC, R primer CTCTTCCTGCGACCTCTGTC avec un produit spécifique de 546 pb, Tm (F primer 59,75°C, R primer : 59,83°C), la teneur en GC est de 55% pour l'amorce sens et 60% pour l'amorce anti-sens et une longueur de 20 nucléotides pour les deux amorces, et la paire 8, F primer CATGCCTCTCTGGCAGTCTT, R primer CAAGCCGTGTAAAGCAGTGG avec un produit spécifique de 479 pb, Tm (F primer 59,75°C, R primer : 59,76°C), la teneur en GC est de 55% pour l'amorce sens et anti-sens et une longueur de 20 nucléotides pour les deux amorces.

Conclusion : Le choix d'une bonne paire d'amorces pour amplifier les gènes *CYP27B1* et *VDR* par PCR constitue une étape primordiale dans la réussite de cette technique et dans l'étude du rôle de ces gènes dans l'immunité anti infectieuse.

Mots clés : *M. tuberculosis*, Macrophage, Vitamine D, *CYP27B1*, *VDR*, PCR

Abstract

Introduction: *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) is a Gram-positive, intracellular pathogen responsible for tuberculosis in humans. The macrophage is a key cell of the immune system that destroys this pathogen. This destruction may be favorized by vitamin D, which stimulates the expression of the *CYP27B1* and *VDR* genes, promoting the production of antimicrobial peptides.

Objective: Design of primers flanking the *CYP27B1* and *VDR* genes expressed by macrophages to study their expression in macrophages during *M. tuberculosis* infection.

Material and Methods: To design primers specific to the *CYP27B1* and *VDR* genes, several tools were used: the Ensembl database to find the specific sequences of the studied genes, and the Primer-BLAST tool provided by NCBI to design the primers. The results were confirmed by *in silico* PCR.

Results: Using the Primer-BLAST tool, a specific primer pair for the *CYP27B1* gene (pair 6) was obtained: F primer TCCCGACTCTTAGCAGAGGG and R primer AGGATAAGGAGGTAGGCGGG. This pair yields a specific product of 866 bp, with a T_m of 60.40°C for the F primer and 60.18°C for the R primer. The GC content is 60% for both the sense and antisense primers, and both have a length of 20 nucleotides. For the *VDR* gene, two pairs were identified. Pair 6 (F primer: TTCATGCCTCTCTGGCAGTC; R primer: CTCTTCCTGCGACCTCTGTC) yields a specific product of 546 bp, with a T_m of 59.75°C (F primer) and 59.83°C (R primer), a GC content of 55% for the sense primer and 60% for the antisense primer, and a length of 20 nucleotides for both. Pair 8 (F primer: CATGCCTCTCTGGCAGTCTT; R primer: CAAGCCGTGTAAAGCAGTGG) yields a specific product of 479 bp, with a T_m of 59.75°C (F primer) and 59.76°C (R primer), a GC content of 55% for both sense and antisense primers, and a length of 20 nucleotides for both.

Conclusion: The selection of a suitable primer pair to amplify the *CYP27B1* and *VDR* genes by PCR is a critical step for the success of this technique and for studying the role of these genes in anti-infective immunity.

Keywords: *M. tuberculosis*, Macrophage, Vitamin D, *CYP27B1*, *VDR*, PCR

الملخص

المقدمة: المتفطرة السلية هي بكتيريا إيجابية الجرام وممرض داخل خلوي مسؤول عن مرض السل لدى الإنسان. تُمثل الخلية البلعمية الكبيرة خلية أساسية في جهاز المناعة تعمل على تدمير هذا الممرض، ويتم التوسط في هذا التفاعل بواسطة فيتامين د الذي يحفز التعبير الجيني للجينين *CYP27B1* و *VDR*، مما يعزز إنتاج الببتيدات المضادة للميكروبات

الهدف: تصميم بادئات لدراسة التعبير الجيني للجينين *CYP27B1* و *VDR* للذين يتم التعبير عنهما في الخلايا البلعمية الكبيرة، وذلك بهدف دراسة تعبيرهما الجيني في إطار المناعة ضد العدوى.

المواد والطرق: من أجل تصميم بادئات خاصة بالجينين *CYP27B1* و *VDR*، قاعدة البيانات "Ensembl" للعثور على التسلسل الجيني المحدد للجينات المدروسة، وأداة Primer-BLAST لتصميم البادئات التي يوفرها المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI) وقد تم تأكيد النتائج بواسطة محاكاة حاسوبية لتفاعل البوليميراز المتسلسل (In silico PCR).

النتائج: أتاح استخدام أداة Primer-BLAST الحصول على بادئ خاص بجين *CYP27B1* (الزوج 6)، وهو كالتالي: البادئ الأمامي (F) TCCCGACTCTTAGCAGAGGG، والبادئ العكسي (R) AGGATAAGGAGGTAGGCGGG، مع منتج محدد طوله 866 زوج قاعدة، ودرجة انصهار (Tm) تبلغ 60.40°م للبادئ الأمامي و 60.18°م للبادئ العكسي. كانت نسبة 60% GC لكل من البادئين وطول كل منهما 20 نيوكليوتيد. بالنسبة لجين *VDR*، تم العثور على زوجين من البادئات؛ الزوج 6، البادئ الأمامي TTCATGCCTCTCTGGCAGTC، والبادئ العكسي CTCTTCCTGCGACCTCTGTC، مع منتج طوله 546 زوج قاعدة، ودرجة انصهار 59.75°م للبادئ الأمامي و 59.83°م للبادئ العكسي. كانت نسبة 55% GC للبادئ الأمامي و 60% للبادئ العكسي، وطول كل بادئ 20 نيوكليوتيد. أما الزوج 8، فكان البادئ الأمامي CATGCCTCTCTGGCAGTCTT والبادئ العكسي CAAGCCGTGTAAAGCAGTGG، مع منتج طوله 479 زوج قاعدة، ودرجة انصهار 59.75°م للبادئ الأمامي و 59.76°م للبادئ العكسي، ونسبة 55% GC لكل من البادئين، وطول 20 نيوكليوتيد لكل منهما.

الخلاصة: يُعتبر اختيار زوج مناسب من البادئات لتكبير جيني *CYP27B1* و *VDR* بواسطة تقنية الـ PCR خطوة أساسية لنجاح هذه التقنية ودراسة دور هذه الجينات في المناعة المضادة للعدوى

الكلمات المفتاحية: العصية السلية، الخلايا البلعمية (الماكروفاغ)، فيتامين د، *CYP27B1*، *VDR*، تفاعل البوليميراز المتسلسل

Avant-propos

Tout d'abord, nous exprimons nos profonds remerciements à Allah qui nous a guidé sur le droit chemin tout au long de ce travail, et qui nous a accordé la santé, le courage et la patience nécessaires pour le mener à bien

Au terme de ce mémoire, nous tenons à exprimer nos remerciements les plus sincères à notre encadrante Dr. NOUARI Wafa Maître de Conférences de Classe B au Département de Biologie- Université de Tlemcen. Merci beaucoup pour votre aide, votre disponibilité, votre dynamisme et votre rigueur scientifique et vos précieux conseils.

Nous tenons également à remercier les membres du jury qui ont accepté d'examiner ce travail.

Nos vifs remerciements s'adressent également à l'ensemble de nos enseignants tout au long de notre cursus universitaire, ainsi qu'à toute l'équipe du laboratoire Biomolim ainsi qu'à nos camarades de la promotion Master 2 Immunologie 2024/2025 pour leur soutien, leur collaboration et les échanges enrichissants tout au long de cette année."

Entièrement et tous ceux qui nous ont soutenus directement ou indirectement, même avec un mot gentil, ou ont prié Dieu pour que nous achevions ce travail avec sérieux et perfection.

Dédicace

Je dédie ce travail à :

La douce mémoire de ma chère grand-mère — que Dieu lui accorde Sa miséricorde.

Son amour, ses prières et sa sagesse demeurent à jamais une source d'inspiration dans ma vie.

Mes chers parents, sans qui je ne serais rien aujourd'hui. Vous m'avez toujours soutenu, et j'espère que vos bénédictions m'accompagneront à chaque étape de ma vie. »

Ma famille Brahimi, pour votre amour, votre soutien et votre présence précieuse tout au long de ce parcours. Votre confiance en moi a été une force inestimable.

Mes chères sœurs, Hadjar, et Soumia et mes frère Khaled, Hassen et Houssine Vous avez toujours été à mes côtés.

Mes chères amies : Meryem, Merwa, Chaimaa, Naoul, Rania, Kawter et Rafika, Merci pour votre présence, votre écoute, vos sourires et votre soutien inconditionnel.

FATIMA ZOHRA

Je dédie ce travail à :

Mes parents qui m'ont apporté tout leur soutien et m'ont encouragée,

Mes chères sœurs, Amel, et Ilham et mon frère Mohamed, Vous avez toujours été à mes côtés.

Je remercie mes chères amies : Fatima Zohra, Merwa, Chaimaa, Naoul, Rania Pour les beaux souvenirs que nous avons créés ensemble.

MERYEM

Table de matière

Abstract

الملخص

Avant-propos

Introduction.....	1
Chapitre 1. Revue de la Littérature	3
1.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3
1.1.1. Historique.....	3
1.1.2. Définition.....	3
1.1.3. Taxonomie et classification	4
1.1.4. Structure de l'enveloppe de <i>M. tuberculosis</i>	4
1.1.5. Transmission	5
1.1.6. Diagnostic	6
1.1.7. Traitement.....	7
1.1.8. Prevention.....	7
1.1.9. Elimination du <i>M. tuberculosis</i> par l'hôte.....	8
1.2. Macrophage	9
1.2.1. Définition.....	9
1.2.2. Ontogénie.....	9
1.2.3. Phénotypes	10
1.2.4. Fonctions	12
1.2.5. Macrophage et <i>M. tuberculosis</i>	15
1.3. Vitamine D.....	17
1.3.1. Historique.....	17
1.3.2. Définition.....	17
1.3.3. Origine.....	18
1.3.4. Métabolisme.....	19
1.3.5. Récepteur de la vitamine D.....	20
1.3.6. Fonctions biologiques de vitamine D.....	21
1.3.6.1. Vitamine D et neurologie	21
1.3.6.2. Vitamine D et cycle cellulaire	21
1.3.7. Vitamine D et régulation immunitaire.....	22
1.4. Réaction en chaîne par polymérase	23

Table de matières

1.4.1.	Définition.....	23
1.4.2.	Acteurs de la PCR.....	23
1.4.3.	Etapes de la PCR.....	23
1.4.4.	Types de la PCR	25
1.4.5.	Analyse des résultats du PCR	25
1.5.	Problématique.....	26
1.5.1.	Objectif.....	26
	But	26
2.1.	Conception d'amorce	27
2.1.1.	Définition.....	27
2.1.1	Critère de choix d'amorces	27
2.1.2	Logiciels et base de données utilisés dans le travail.....	28
2.2	Gènes étudiés.....	29
2.2.1	CYP27B1	29
2.2.2.	VDR.....	34
2.2.3.	PCR <i>in silico</i>	37
Chapitre 3.	Résultats	39
3.1.	Résultats du primer blast.....	39
3.2	Confirmation des résultats	41
Chapitre 4.	Conclusions et perspectives.....	43
Chapitre 5.	Références bibliographiques	44

Liste des figures

Figure 1.1. Structure de l'enveloppe du <i>M. tuberculosis</i>	19
Figure 1.2 Cascade de transmission de la tuberculose	20
Figure 1.3. Origine du macrophage	24
Figure 1.4. Polarisation de macrophage	26
Figure 1.5. Macrophage et <i>M. tuberculosis</i>	30
Figure 1.6. Structure chimique de la vitamine D2 et de la vitamine D3	32
Figure 1.7. Métabolisme et le récepteur de la vitamine D	34
Figure 1.8. Les étapes de la réaction en chaîne par polymérase (PCR)	38
Figure 2.1. Localisation de gène <i>CYP27B1</i> sur le chromosome 12	43
Figure 2.2. Plateforme de la base de données Ensembl	44
Figure 2.3. Résultats de la recherche du gène <i>CYP27B1</i>	44
Figure 2.4. Caractéristiques du gène <i>CYP27B1</i>	45
Figure 2.5. La séquence du gène <i>CYP27B1</i> depuis la plateforme (Ensembl)	45
Figure 2.6. La séquence d'intérêt (exon 4)	46
Figure 2.7. Base de données NCBI	47
Figure 2.8. Outil Primer Blast	47
Figure 2.9. Analyse de la séquence d'intérêt par le Primer blast	48
Figure 2.10. Paramètres de vérification de la spécificité des paires d'amorces	48
Figure 2.11. Localisation de gène <i>VDR</i> sur le chromosome 12	49
Figure 2.12. Résultats de la recherche du gène <i>VDR</i>	49
Figure 2.13. Caractéristiques du gène <i>VDR</i>	50
Figure 2.14. La séquence du gène <i>VDR</i> depuis la plateforme (Ensembl)	50
Figure 2.15. La séquence d'intérêt (exon 3)	51
Figure 2.16. Analyse de la séquence d'intérêt par le Primer blast	51
Figure 2.17. Paramètres de vérification de la spécificité des paires d'amorces	52
Figure 2.18. Logiciel in-silico PCR	53
Figure 3.1. La paire d'amorce choisie pour le gène <i>CYP27B1</i> par l'outil primer blast (paire 6)	54
Figure 3.2. Résultats du gène <i>VDR</i> (paire 6) par l'outil primer blast	54
Figure 3.3. Résultats du gène <i>VDR</i> paire 8 par l'outil primer blast	55
Figure 3.4. Confirmation des résultats par le logiciel in Silico-PCR pour <i>CYP27B1</i> (paire6)	55
Figure3.5. Confirmation des résultats par le logiciel in Silico-PCR pour <i>VDR</i> (paire 6)	56

Figure 3.6. Confirmation des résultats par le logiciel in Silico-PCR pour VDR (paire 8)	56
--	----

Listes des tableaux

Tableau 1.1. Classification de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	18
Tableau 1.2. Les différents types de macrophages résidents	23
Tableau 3.1. Aliments naturellement riches en vitamine D	33
Tableau 3.2. La comparaison entre les critères d'une bonne amorce et notre amorce	55

LISTE DES ABRÉVIATIONS

1,25(OH)2D3 : 1,25-dihydroxy-vitamine D3 ou calcitriol

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

A

A : Adénine

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AG : Arabinogalactane

AM : Acide mycoliques

APC : Cellules présentatrices d'antigènes

Arg-1 : Arginase-1

ARNm : Acide Ribonucléique messager

B

BAAR : Bacilles Acido-Alcool-Résistants

BAX : Protéine X associée à Bcl-2

BCG : Bacillus-Calmette-Guérin

BCL2 : Lymphome B-cellulaire 2

BCL-XL : Lymphome B-cellulaire - extra large

C

C : Cytosine

CD : Cluster of differentiation

CDKI : Inhibiteurs kinases dépendantes des cyclines

C-IAP1 : Protéine inhibitrice cellulaire de l'apoptose 1

Cl⁻ : Ion chlorure

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CMP : Progéniteurs myéloïdes communs

CR : Récepteurs du complément

CSH : Cellules souches hématopoïétiques

CXC : cystéine-acide aminé quelconque-cystéine

CXCL : Ligand de chimiokine avec motif C-X-C

CYP27A1 : Cytochrome P450, famille 27, sous-famille A, membre 1

CYP27B1 : Cytochrome P450, famille 27, sous-famille B, membre 1

CYP2R1 : Cytochrome P450, famille 2, sous-famille R, membre 1

D

DBP : protéine liant la vitamine D

DC : Cellules dendritiques

dNTPs : Désoxyribonucléosides triphosphates

E

EMB : Éthambutol

EMP : Erythro-myéloïdes progéniteurs

ERO : Oxydoréductase du réticulum endoplasmique

F

FC : fragment cristallisé

G

G : Guanine

GABA : Acide Gamma-Aminobutyrique

Liste des abréviations

GM-CSF : Facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages

GMP : Progéniteurs des granulocytes et des macrophages

H

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

I

IFN- γ : Interféron gamma

IGF : Facteur de croissance analogue à l'insuline

IGRA : Test de libération d'interféron gamma

IL : interleukine

INH : Isoniazide

iNOS : Inductible nitrique oxide synthase

L

LAM: Lipo-arabinomannane

LPS: Lipopolysaccharides

M

M. tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis*

M1 : macrophage classiquement activé

M2 : macrophage alternativement activé

MA : Macrophages alvéolaires

MDMs : Macrophage dérivé des monocytes

MI : Macrophages interstitiels

MM : Mycomembrane

mVDR : Récepteur nucléaire de la vitamine D

N

NADPH : nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate

NCBI : Centre national d'information sur les biotechnologies

NGF : Facteur de croissance nerveuse

NO : Oxyde nitrique

NOX : NADPH oxydase

nVDR : Récepteur nucléaire de la vitamine D

O

O₂⁻ : superoxyde

P

p21WAF1/CIP1 : Inhibiteur de la kinase dépendante des cyclines 1A (CDKN1A)

P27kip1 : Inhibiteur de la kinase dépendante des cyclines 1B (CDKN1B)

PAMP : Motif moléculaire associé aux agents pathogènes

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

PG: Peptidoglycan

PIM: Phosphatidyl- inositol-mannosides

PKA : Protéine kinase A

PKC : protéine kinase C

PZA : Pyrazinamide

R

RE : Réticulum endoplasmique

RMP : Rifampicine

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

RXR : Récepteur du rétinoïde X

Liste des abréviations

S

SIDA : Syndrome d'Immunodéficience
Acquise

T

T : Thymine

TAAN : Test d'amplification des acides
nucléiques

TB : Tuberculose

TGF- β : Facteur de croissance
transformant β

Th: lymphocyte T helper

TLR: Toll like-recptor

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale
alpha

Treg : Lymphocyte T régulateur

U

UCSC : Navigateur génomique de
l'Université de Californie à Santa Cruz

UVB : ultraviolet B

V

VDR : Récepteur de la vitamine D

VDRE : Élément de réponse de la
vitamine D

VEGF : Facteur de croissance de
l'endothélium vasculaire

VIH : Virus de l'Immunodéficience
Humaine

X

XIAP : Protéine inhibitrice de
l'apoptose liée à l'X

Z

ZN : Ziehl-Neelsen

Introduction

Mycobacterium tuberculosis (*M. tuberculosis*) est une bactérie intracellulaire (H. Zhang et al. 2022) et l'agent étiologique de la tuberculose (TB) (Mashabela, De Wet, et Warner 2019). Elle est transmise par voie aérienne via l'inhalation de gouttelettes contenant la bactérie (Sia et Rengarajan 2019), qui pénètrent dans les voies respiratoires pour atteindre principalement les poumons (Pezzella 2019). L'infection induit une réponse immunitaire de l'hôte, caractérisée par la formation de granulomes, structures tissulaires complexes composées de différentes cellules immunitaires, visant à contenir la prolifération bactérienne (McCaffrey et al. 2022).

Les macrophages constituent des cellules effectrices clés de l'immunité innée et adaptative (Hegarty, Jones, et Bain 2023), impliquées dans de multiples processus physiopathologiques, tels que la défense contre les agents pathogènes, les réponses inflammatoires aiguës et chroniques, ainsi que le maintien de l'homéostasie et le remodelage des tissus (L. Wang et al. 2019). En réponse à différents signaux, les macrophages peuvent se polariser en deux principaux phénotypes fonctionnels : les macrophages de type M1 et M2 (Gensel et Zhang 2015). Le phénotype M1 est associé à une activité pro-inflammatoire, favorisant l'élimination des agents pathogènes et des cellules tumorales. En revanche, les macrophages M2 présentent un profil anti-inflammatoire, contribuant principalement à la réparation tissulaire et à la résolution de l'inflammation (Atri, Guerfali, et Laouini 2018).

La vitamine D, une pro-hormone liposoluble de nature stéroïdienne, existe principalement sous deux formes : la vitamine D₂ (ergocalciférol), d'origine végétale et fongique, et la vitamine D₃ (cholécalficérol), synthétisée dans la peau humaine sous l'effet des rayons UVB et également apportée par des sources alimentaires animales (Ramasamy 2020a). Une fois dans l'organisme, la vitamine D₃ est transportée vers le foie, où elle est hydroxylée par la 25-hydroxylase hépatique en 25-hydroxyvitamine D [25(OH)D ou calcidiol]. Cette dernière est ensuite convertie au niveau rénal, sous l'action de l'enzyme 25-hydroxyvitamine D-1 α -hydroxylase (*CYP27B1*), en sa forme biologiquement active : la 1,25-dihydroxyvitamine D₃ [1,25(OH)₂D₃ ou calcitriol] (Delrue et Speeckaert 2023a). Le calcitriol exerce ses effets en se liant au récepteur nucléaire de la vitamine D (VDR), exprimé dans diverses cellules cibles. Le complexe VDR activé s'associe au récepteur du rétinoïde X (RXR) pour former un hétérodimère, qui régule l'expression génique en se fixant aux éléments de réponse à la vitamine D (VDRE) situés dans les régions promotrices des gènes cibles, modulant ainsi un large éventail de fonctions biologiques (Jeon et Shin 2018a). Parmi ses fonctions, la vitamine D exerce un rôle essentiel dans la régulation du système immunitaire, en intervenant à la fois dans l'immunité innée et adaptative. Dans l'immunité innée, elle contribue à la limitation de la prolifération de *M. tuberculosis* au sein des macrophages, en induisant la production du peptide antimicrobien cathélicidine (Andraos et al. 2011). Par ailleurs, elle favorise

Introduction

L'établissement d'une tolérance immunitaire en inhibant la synthèse d'IL-12, tout en augmentant celle d'IL-10, ce qui conduit à l'activation des lymphocytes T régulateurs (Treg) et à la suppression de la réponse Th1 (Umar, Sastry, et Chouchane 2018a). Au sein de l'immunité adaptative, la vitamine D module également la fonction des lymphocytes B en inhibant leur différenciation en plasmocytes, en induisant leur apoptose et en réduisant leur activation dépendante des cytokines (Charoenngam et Holick 2020).

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) est une méthode d'amplification qui permet de produire un grand nombre de copies d'un fragment d'ADN spécifique, défini par sa séquence et sa taille. Elle utilise une ADN polymérase pour amplifier la région cible encadrée par deux amorces Oligo nucléotidiques complémentaires situées sur des brins opposés. Cette technique permet d'obtenir, en quelques heures, des millions de copies de l'ADN d'intérêt à partir d'un échantillon complexe (Ghannam et Varacallo 2025).

Dans cette d'ordre d'idée, l'objectif de ce travail est de concevoir des amorces pour les gènes *CYP27B1* et *VDR* afin d'étudier par PCR leur expression dans le macrophage et aussi leur implication dans l'infection par *M. tuberculosis*.

Chapitre 1. Revue de la Littérature

1.1. *Mycobacterium tuberculosis*

1.1.1. Historique

La découverte de l'agent responsable de la tuberculose pulmonaire remonte à l'année 1882, lorsque le médecin allemand Robert Koch présenta devant la Société de physiologie de Berlin un micro-organisme qu'il le nomma *Tuberkelvirus*. Ce n'est qu'en 1883 que ce germe pathogène fut officiellement nommé *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Cette avancée majeure dans le domaine de la microbiologie valut à Robert Koch l'obtention du prix Nobel de physiologie ou médecine en 1905 (Cambau et Drancourt 2014).

1.1.2. Définition

M. tuberculosis, l'agent responsable de la tuberculose chez l'homme (Gagneux 2018), se classe comme la deuxième cause de mortalité due à une infection après le VIH/SIDA (Khatua, Geltemeyer, et Gourishankar 2017). Ce sont des pathogènes intracellulaires à Gram positif en forme de bâtonnet, aérobies non sporulés, non mobiles et à croissance lente (H. Zhang et al. 2022). De plus, il s'agit d'une bactérie intracellulaire obligatoire qui utilise l'organisme humain pour se nourrir et assurer une persistance prolongée (Mashabela, De Wet, et Warner 2019). Bien que cette bactérie affecte principalement les poumons, elle peut également atteindre d'autres organes par diffusion hématogène, propagation lymphatique ou extension locale, entraînant ainsi une tuberculose extra-pulmonaire (Pezzella 2019), causant des symptômes comme une toux sévère, de la fièvre et des douleurs thoraciques (Fogel 2015). Des observations montrent également que des bacilles peuvent rester vivants dans le corps d'un individu asymptomatique pendant des décennies (Mashabela, De Wet, et Warner 2019).

1.1.3. Taxonomie et classification

Le tableau 1.1 représente la classification de *M. tuberculosis*.

Tableau 1.1. Classification de *Mycobacterium tuberculosis*(Koch et Mizrahi 2018).

Règne	Bactéries
Phylum	Actinobactéries
Classe	Actinomycétales
Ordre	Mycobactériales
Famille	Mycobacteriaceae
Genre	Mycobacterium
Espèce	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

1.1.4. Structure de l'enveloppe de *M. tuberculosis*

L'enveloppe cellulaire de *M. tuberculosis* est une structure complexe qui joue un rôle crucial dans sa pathogénicité et sa résistance aux médicaments. Elle est composée de trois éléments principaux (figure 1.1) : la membrane plasmique interne, la paroi cellulaire et une couche externe de type capsulaire (P. Singh et al. 2018). La membrane plasmique est composée de phospholipides et des protéines. Les principaux phospholipides sont phosphatidyl- inositol-mannosides (PIM), le phosphatidyl glycérol, le cardiolipide et la phosphatidyl éthanolamine. Outre les phospholipides, d'autres lipides, tels que les ménaquinones, peuvent être présents dans la membrane plasmique. Les lipopolysaccharides (LPS) mycobactériens, tels que le Lipo-arabinomannane (LAM) et le lipomannane sont en partie localisés dans la membrane. Les teneurs relatives de ces deux LPS dépendent de la phase de croissance (Daffé et Marrakchi 2019).

La paroi cellulaire présente une structure complexe composée d'une bicouche membranaire externe, d'arabinogalactane (AG) et de peptidoglycane (PG). La membrane externe mycobactérienne, également connue sous le nom de mycomembrane (MM), présente une épaisseur de 7 à 8 et contient des acide mycoliques (AM). Les AM forment le feuillet interne de la MM, lié de manière covalente à AG, où ils sont liés de manière covalente au PG (Jacobo-Delgado et al. 2023).

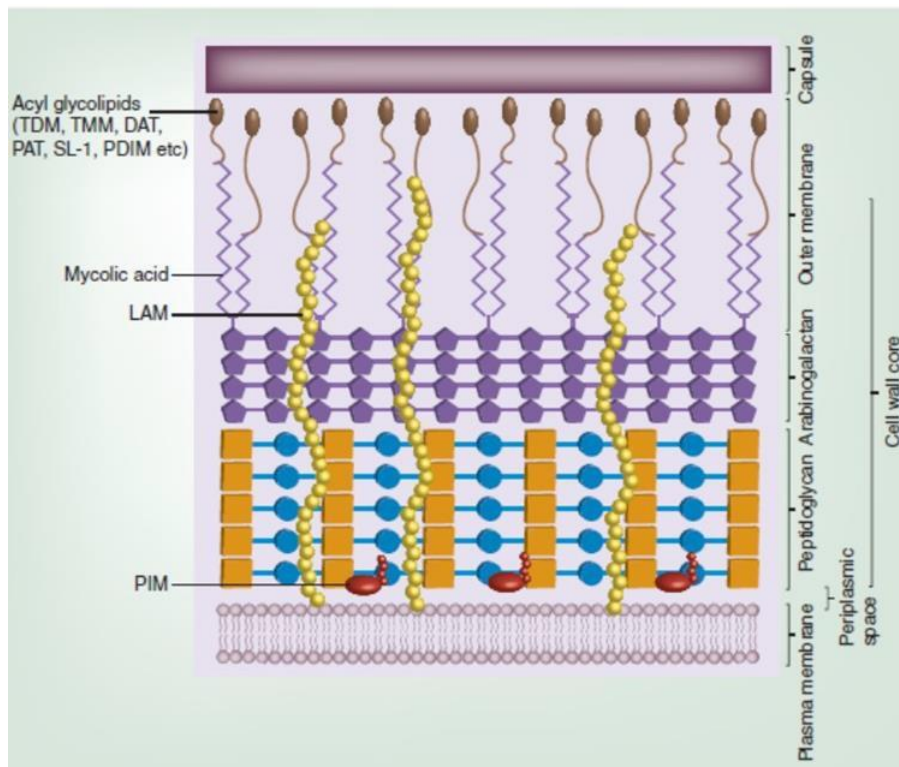


Figure 1.1. Structure de l'enveloppe du *M. tuberculosis* (P. Singh et al. 2018). LAM : le lipo-a-rabinomannane; PIM : phosphatidyl- inositol-mannosides

La couche capsulaire est une matrice de glucane qui contient des protéines, de LPS et de petites quantités de lipides (Daffé et Marrakchi 2019).

1.1.5. Transmission

La transmission du bacille tuberculeux se fait principalement par d'un des particules aérosolisées générées par un individu infecté. Le risque de transmission de *M. tuberculosis* dépend de plusieurs facteurs :

- la concentration de gouttelettes infectieuses dans l'air.
- la durée d'exposition à ces particules.
- la proximité du contact avec les personnes infectées.
- et la sensibilité de l'hôte et l'infectiosité de la souche de *M. tuberculosis* (Segal-Maurer 2017).

Il y a une cascade simple de transmission de la tuberculose dans laquelle (Figure 1.2) (1) un individu infecté par la tuberculose, (2) émet des particules infectieuses, (3) qui restent en suspension dans l'air, (4) et sont inhalées par une personne vulnérable, (5) qui peut alors être infectée, (6) et développer par la suite la maladie (Churchyard et al. 2017).

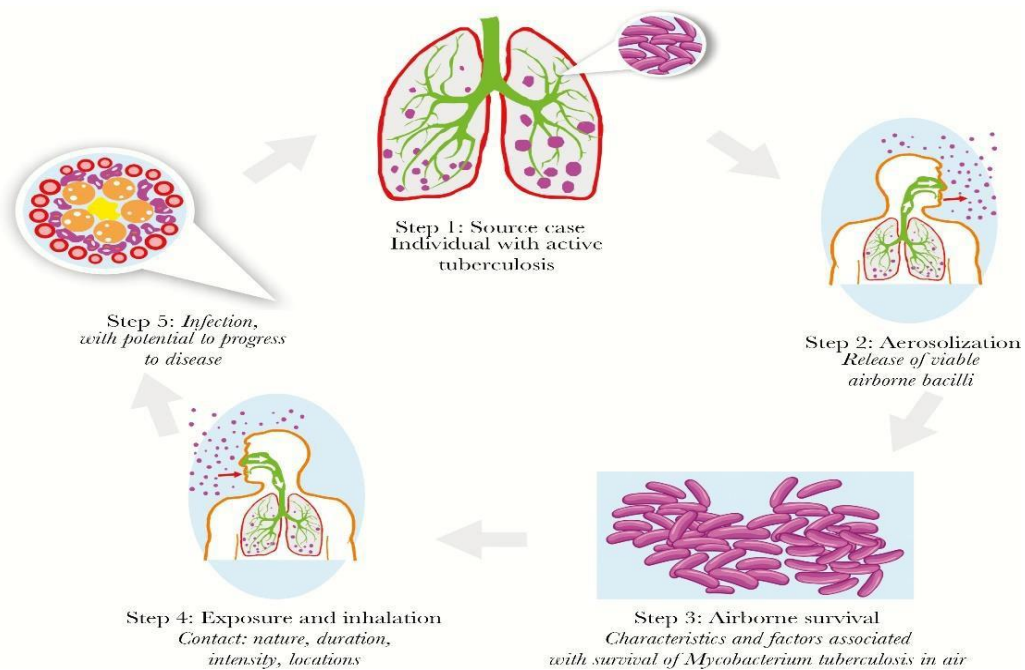


Figure 1.2 Cascade de transmission de la tuberculose (Churchyard et al. 2017).

1.1.6. Diagnostic

Pour détecter la présence de *M. tuberculosis* et évaluer l'état de l'infection, plusieurs tests peuvent être appliquées. Ces tests incluent :

- Les tests de libération d'interféron gamma (IFN- γ) (IGRA) : ces tests détectent la sécrétion de l'IFN- γ par les lymphocytes T, qui sont stimulés par des antigènes relativement spécifiques de la tuberculose.
- La radiographie thoracique est largement utilisée pour la détection de la tuberculose pulmonaire (Suárez et al. 2019).
- La microscopie directe est une méthode rapide et peu coûteuse qui utilise le colorant de Ziehl-Neelsen (ZN) pour identifier les bacilles acido-résistants (BAAR). L'échantillon était qualifié de « frottis positif » ou « frottis négatif », selon la présence ou l'absence de BAAR.
- Les tests d'amplification des acides nucléiques (TAAN) pour la détection de l'ADN ou de l'ARN mycobactériens sont de plus en plus développés pour une utilisation clinique
- La détection urinaire du LAM. Le LAM est un composant glycolipidique de 17,5 kD de la paroi cellulaire externe des mycobactéries. Le LAM est thermostable, éliminé par les reins et détectable dans les urines. En tant que produit bactérien, il a le potentiel théorique de distinguer la tuberculose active de l'infection latente, la première présentant des quantités plus élevées de bactéries (Shingadia 2012).

1.1.7. Traitement

Lorsqu'un traitement antituberculeux est administré rapidement et qu'il est de haute qualité, il agit rapidement pour réduire la quantité de bacilles réplicatifs, réduire la gravité de la maladie et le risque de mortalité lié à la tuberculose, et le patient devient moins contagieux (Dobbs et Webb 2017).

Le traitement standard de la tuberculose pulmonaire consiste en une première phase de 2 mois avec une combinaison de quatre médicaments :

- Isoniazide (INH) : est bactéricide pour les organismes extracellulaires et intracellulaires en division active.
- Rifampicine (RMP) : est bactéricide contre des organismes qui résident dans un environnement extracellulaire, qui se multiplie activement dans les débris caséux liquides présents dans les cavités pulmonaires. RMP inhibe l'ARN polymérase ADN-dépendante de *M. tuberculosis*.
- Éthambutol (EMB) : ne tue pas les bactéries, mais empêche leur croissance.
- Pyrazinamide (PZA) : est bactéricide pour les organismes intracellulaires et il est particulièrement efficace dans des environnements acides. PZA perturbant l'activité membranaire (Dobbs et Webb 2017).

Puis, pour les 4 mois suivants, il passe à une administration uniquement de rifampicine et d'isoniazide.

Les formes extra pulmonaires et disséminées de la tuberculose nécessitent parfois un traitement plus long (tuberculose ganglionnaire, 6 mois ; tuberculose articulaire ou osseuse, 9 mois ; tuberculose du système nerveux central, 12 mois) (Suárez et al. 2019). Cette période prolongée augmente la chance d'échec du traitement et la probabilité de développement de résistances médicamenteuses (V. Singh et Chibale 2021).

1.1.8. Prévention

Les principales méthodes de prévention actuellement proposées comprennent le vaccin Bacillus-Calmette-Guérin (BCG) et de nouveaux vaccins candidats en phase de développement (Vasiliu et al. 2024). Le vaccin BCG est actuellement le seul vaccin approuvé et couramment utilisé pour la prévention de la tuberculose chez l'homme. Son efficacité est surtout démontrée chez les jeunes enfants, en particulier pour les formes sévères de la tuberculose (Mangtani et al. 2014). Cependant, l'efficacité n'a été observée que chez les enfants de moins de 5 ans, ce qui implique qu'il est nécessaire de développer de nouveaux vaccins pour prévenir la tuberculose chez les populations plus âgées (Martinez et al. 2022).

1.1.9. Elimination du *M. tuberculosis* par l'hôte

Suite à l'inhalation de gouttelettes aérosolisées contenant *M. tuberculosis*, les bactéries atteignent les alvéoles pulmonaires où elles sont phagocytées par les macrophages résidents. Ces derniers libèrent des cytokines, des chimiokines et d'autres médiateurs inflammatoires, attirant ainsi des leucocytes supplémentaires depuis la circulation vers le site d'infection (Subbian et al. 2015). Cela provoque une réponse immunitaire qui conduit à la formation d'un granulome, une structure tissulaire complexe et organisée, constituée de macrophages, granulocytes, lymphocytes et fibroblastes (McCaffrey et al. 2022). Au centre du granulome, les macrophages fortement infectés sont incapables de limiter la croissance des bacilles. Ces bactéries peuvent être ingérées par les macrophages nouvellement recrutés, ce qui stimule davantage le recrutement et l'activation des cellules immunitaires, favorisant ainsi la formation de granulomes plus étendus et structurés (Russell et al. 2009).

1.2. Macrophage

1.2.1. Définition

Le concept du système macrophage a été présenté pour la première fois par Elie Metchnikoff à la fin du 19^e siècle, lorsqu'il a décrit l'activité phagocytaire de ces cellules (Davies et al. 2013). Les macrophages sont des éléments fondamentaux du système immunitaire, impliqués dans l'immunité innée et adaptative (Hegarty, Jones, et Bain 2023). Ces cellules sont présents dans tous les tissus de l'organisme et représentent des phénotypes extrêmement plastiques et hétérogènes qui s'adaptent en fonction du tissu et de l'organe dans lesquels ils résident (Atri, Guerfali, et Laouini 2018) (tableau 1.2).

Les macrophages occupent une place essentielle dans divers processus physiologiques et pathologiques, notamment le développement des organes, la défense immunitaire, les réponses inflammatoires aiguës et chroniques, ainsi que le maintien de l'homéostasie et le remodelage tissulaire (L. Wang et al. 2019). Ils disposent d'un large répertoire de récepteurs liés à l'immunité innée, tels que les récepteurs de type Toll (TLR), les inflammasomes et les récepteurs de type lectine, présents de manière ciblée à la surface cellulaire, dans le cytoplasme et dans les structures endosomales (Locati, Curtale, et Mantovani 2020).

Tableau 1.2. Les différents types de macrophages résidents (Mosser et Edwards 2008).

Localisation	Type de cellule
OS	Ostéoclaste
Système nerveux central	Cellule microgiale
Foie	Macrophages de Kupffer
Poumon	Macrophages alvéolaires
Peau	Cellules de Langerhans

1.2.2. Ontogénie

Les macrophages tissulaires se divisent en macrophage résidents et macrophage dérivé des monocytes (MDMs). La majorité des macrophages résidents sont d'origine fœtale. Ces macrophages embryonnaires ont la capacité de se renouveler et de persister tout au long de la vie dans les tissus adultes. On les distingue en deux catégories : d'une part, les macrophages issus du sac vitellin (figure 1.3), qui jouent un rôle majeur dans la production de la microglie, et d'autre part, ceux dérivés des EMP (Kurotaki, Sasaki, et Tamura 2017). Les MDMs se différencient à partir des monocytes, aussi bien en conditions homéostatiques qu'inflammatoires (Terry et Miller 2014). En amont de cette différenciation, les cellules progénitrices myéloïdes communes (CMP) donnent naissance aux progéniteurs granulocyte-

macrophage (GMP), qui constituent les précurseurs des principales lignées myéloïdes (Trzebanski et Jung 2020).

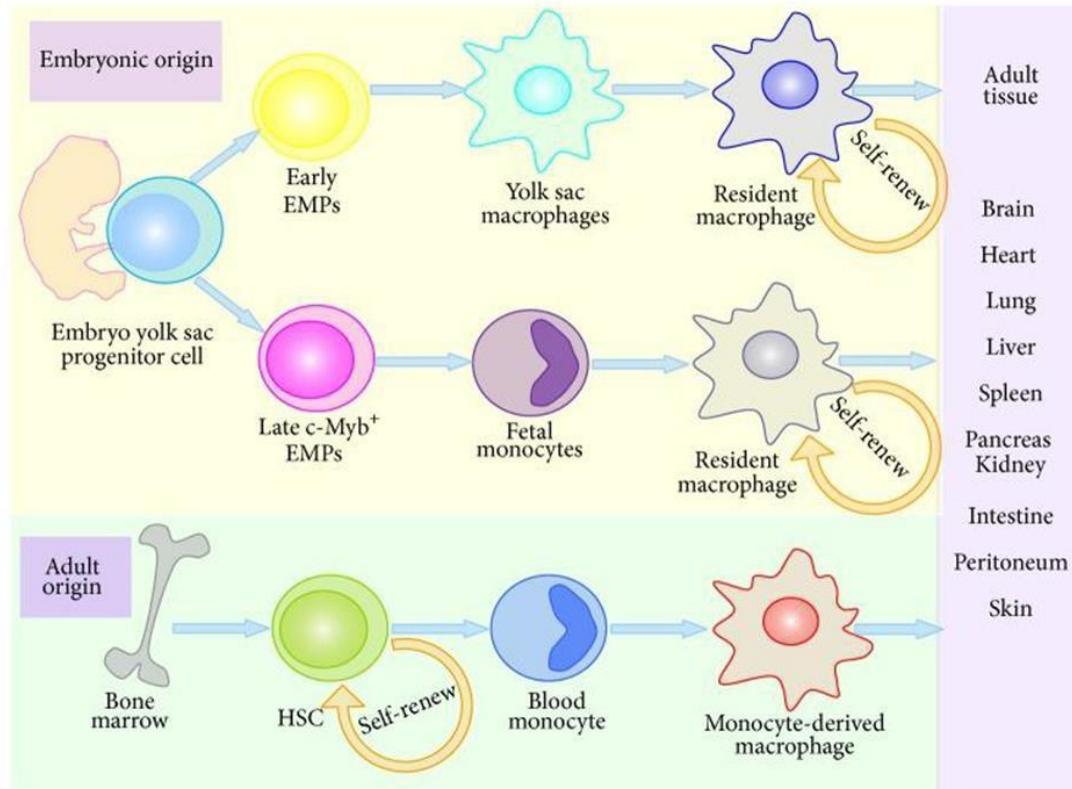


Figure 1.3. Origine du macrophage (Fan et al. 2016).

1.2.3. Phénotypes

Sous l'influence de divers facteurs, les macrophages se transforment en plusieurs phénotypes, chacun ayant des caractéristiques et des effets distincts. Ce phénomène, qui est essentiel pour la régulation des processus physiologiques et pathologiques, est désigné sous le terme de polarisation des macrophages (Shapouri-Moghaddam et al. 2018). Cette polarisation correspond à l'activation de ces cellules sous l'influence de micro-organismes pathogènes, de réponses inflammatoires, de cytokines ou de facteurs physico-chimiques, ce qui entraîne leur différenciation en divers phénotypes (C. Wang et al. 2021).

Les macrophages peuvent être largement classés en deux principaux groupes (Figure 1.4) :

1.2.3.1. Macrophages classiquement activés ou macrophages M1

Les macrophages M1, généralement activés par des ligands TLR tels que le LPS bactérien ou par des cytokines comme l'interféron gamma (IFN- γ), le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) et le facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF), se caractérisent par une forte aptitude à présenter des antigènes. Ils produisent une quantité

importante de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-12 et l'IL-23, ainsi que du Le ligand 9 de la chimiokine (motif CXC)(CXCL9), un ligand de chimiokine de la famille CXC, associé à une faible expression d'IL-10 (Shapouri-Moghaddam et al. 2018).

Sur le plan fonctionnel, les macrophages de type M1 présentent un phénotype pro-inflammatoire, impliqué dans l'élimination des agents pathogènes et des cellules tumorales. Toutefois, leur activation excessive peut entraîner des dommages tissulaires via la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), compromettant ainsi la cicatrisation des plaies et la régénération des tissus (Bashir et al. 2016).

Les macrophages M1 se caractérisent notamment par l'expression de marqueurs tels que CD80, CD86, ainsi que la synthèse inductible de l'oxyde nitrique (iNOS) (K. Zhang et al. 2023).

1.2.3.2. Macrophages alternativement activés ou macrophage M2

Les macrophages M2 sont activés par plusieurs facteurs tels que les cytokines l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13, les glucocorticoïdes, les complexes immunitaires et les LPS. Ils représentent un phénotype anti-inflammatoire et produisent de l'IL-10 et de l'arginase-1 (Arg-1) (Wynn et Vannella 2016) ce qui participe dans la résolution de l'inflammation et la réparation des tissus endommagés (K. Zhang et al. 2023).

Les macrophages de type M2 comprennent quatre sous-populations fonctionnelles : M2a, M2b, M2c et M2d, chacune impliquée dans des fonctions immunomodulatrices particulières.

Les macrophages M2a sont impliqués dans la cicatrisation des plaies et la résolution de l'inflammation, particulièrement après exposition à l'IL-4 ou IL-13 ; les M2b, en réponse à l'IL-1 β ou au LPS, ont des effets à la fois pro- et anti-inflammatoires ; les macrophages M2c participent au remodelage tissulaire (en réponse à l'IL-10) ; et enfin, les macrophages M2d soutiennent la progression tumorale et l'angiogenèse (Shapouri-Moghaddam et al. 2018).

Parmi les marqueurs spécifiques des macrophages de type M2 figurent CD163, CD206 et l'arginase-1 (Arg1) (K. Zhang et al. 2023).

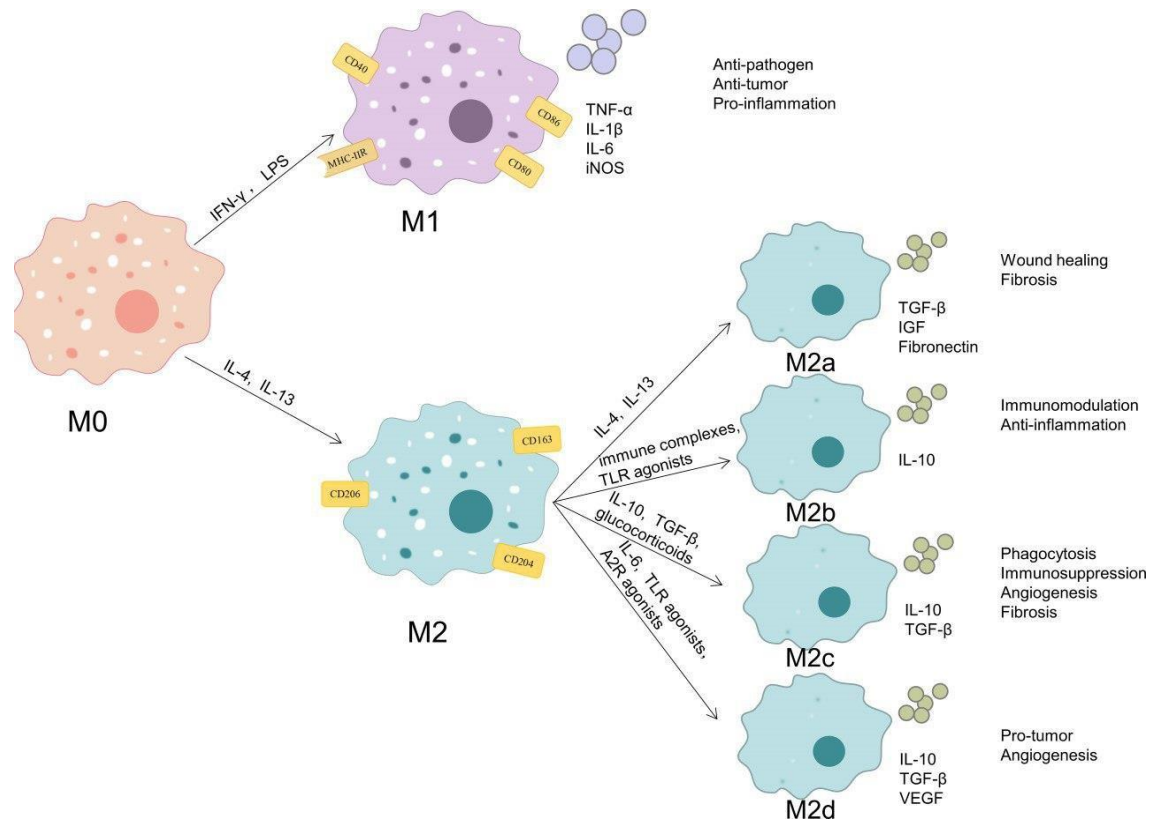


Figure 1.4. Polarisation de macrophage (Xia et al. 2023). En réponse à divers stimuli micro-environnementaux, les macrophages non polarisés (M0) peuvent se différencier en macrophages de type M1 ou M2. Les macrophages M2 sont eux-mêmes subdivisés en quatre sous-types : M2a, M2b, M2c et M2d, chacun présentant des fonctions biologiques distinctes. Les macrophages de type M1 se caractérisent par l'expression de marqueurs de surface tels que CD40, CD80, CD86 et MHC-II, et par la production de médiateurs pro-inflammatoires, notamment le TNF-α, l'IL-1β, l'IL-6 et l'iNOS. Ces cellules sont associées à une forte activité pro-inflammatoire, antimicrobienne et antitumorale. En revanche, les macrophages de type M2, identifiés par l'expression des marqueurs CD163, CD204 et CD206, sont principalement impliqués dans des processus anti-inflammatoires, réparateurs et immunorégulateurs. Les macrophages M2a sécrètent le TGF-β, l'IGF et la fibronectine, contribuant à la cicatrisation tissulaire et à la fibrose. Les macrophages M2b produisent principalement de l'IL-10 et jouent un rôle clé dans la régulation immunitaire. Les macrophages M2c, également producteurs de TGF-β et d'IL-10, sont impliqués dans la phagocytose, l'immunosuppression, l'angiogenèse et le développement de la fibrose. Enfin, les macrophages M2d sécrètent de l'IL-10, du TGF-β et du VEGF, et sont associés à la promotion de l'angiogenèse et à la progression métastatique des tumeurs.

1.2.4. Fonctions

Les macrophages sont des cellules immunitaires qui jouent un rôle clé dans la défense de l'organisme. Ils interviennent principalement dans la phagocytose, la présentation des antigènes et la modulation des réponses immunitaires.

1.2.4.1. Phagocytose

Les macrophages jouent un rôle central dans la défense immunitaire en phagocytant et en éliminant les agents pathogènes ainsi que les cellules apoptotiques. À l'aide de leurs lysosomes, riches en enzymes hydrolytiques, ils dégradent les particules internalisées,

participant ainsi à la lutte contre les infections et au maintien de l'homéostasie cellulaire (Verma et Saraf 2017).

La phagocytose est le processus par lequel des particules supérieures à 0,5 μm sont reconnues et ingérées dans une structure appelée phagosome, qui est dérivée de la membrane plasmique (Rosales et Uribe-Querol 2017). Après la phagocytose, le phagosome subit des modifications structurales et biochimiques au cours d'un processus appelé maturation du phagosome. Il fusionne ensuite avec les lysosomes pour former un phagolysosome, un compartiment spécialisé contenant des enzymes hydrolytiques capables de dégrader la particule internalisée (Uribe-Querol et Rosales 2020).

Les phagocytes doivent identifier une multitude de particules qu'ils peuvent absorber. Cette reconnaissance s'effectue par l'intermédiaire de divers types de récepteurs. On peut classer les récepteurs situés sur la membrane plasmique des phagocytes en deux catégories : non opsoniques et opsoniques (Lafuente, Niedergang, et Rosales 2020).

- Les récepteurs non opsoniques se connectent directement aux motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) et sont capables de déclencher la phagocytose. Ces récepteurs, exprimés de façon variable par les phagocytes professionnels, incluent des molécules de reconnaissance de type lectine comme CD169 et CD33, ainsi que des récepteurs connexes pour les résidus sialylés. En outre, les phagocytes manifestent aussi l'expression du Dectin-1 (un récepteur destiné au bêta-glucane fongique), des lectines de type C associées et des récepteurs scavengers (Gordon 2016).

Même si les récepteurs de type Toll (TLR) sont capables détecter des motifs moléculaires sur les pathogènes, ils ne se comportent pas comme des récepteurs phagocytaires. Cependant, les TLR interagissent fréquemment avec d'autres récepteurs qui ne sont pas opsoniques pour stimuler le processus d'ingestion (Rosales et Uribe-Querol 2017).

- Les récepteurs opsoniques reconnaissent les opsonines, des protéines produites par l'hôte, qui se fixent aux particules étrangères afin de les désigner pour leur ingestion. Les opsonines comprennent notamment les anticorps, la fibronectine, les protéines du complément, la lactadhérine (ou globuline grasse du lait) ainsi que la lectine de liaison au mannose. Elles agissent en marquant les particules cibles, facilitant ainsi leur reconnaissance et leur élimination par les cellules phagocytaires. Parmi les récepteurs opsoniques les plus étudiés figurent les récepteurs FC (FcR) et les récepteurs du complément (CR). Les FcR reconnaissent la région FC des immunoglobulines IgG ou IgA, tandis que les CR interagissent avec les fragments activés du complément, comme l'iC3b, qui se déposent à la surface des particules (Uribe-Querol et Rosales 2020).

La phagocytose est un processus en plusieurs étapes : (i) la reconnaissance de la particule cible, (ii) l'activation des mécanismes d'internalisation, (iii) la formation d'un compartiment intracellulaire appelé phagosome, et (iv) la maturation progressive de ce phagosome jusqu'à sa fusion avec les lysosomes (Lafuente, Niedergang, et Rosales 2020).

1.2.4.2. Présentation de l'antigène

Après avoir phagocyté un agent pathogène, les macrophages exposent des fragments antigéniques à leur surface via les molécules du Complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II. Ces antigènes sont ensuite reconnus par les lymphocytes T CD4+, déclenchant leur activation et favorisant une réponse immunitaire ciblée contre l'agent infectieux (Santa 2023).

1.2.4.3. Régulation des réponses immunitaires

Les macrophages sécrètent différentes cytokines qui modulent l'inflammation. Selon leur phénotype, ils peuvent soit induire une réponse inflammatoire (M1) soit favoriser la réparation tissulaire (M2). En plus de leur rôle dans l'initiation de l'inflammation, ils contribuent à sa résolution et au maintien de l'homéostasie, illustrant leur fonction clé dans l'équilibre immunitaire (Lendeckel, Venz, et Wolke 2022).

1.2.4.4. Rôle bactéricide

Les macrophages ont mis en place diverses stratégies de défense pour lutter contre l'infection provoquée par des bactéries intracellulaires (Weiss et Schaible 2015). Ils possèdent la capacité d'englober et d'éliminer les bactéries ainsi que d'autres agents pathogènes par un mécanisme appelé phagocytose. Ce processus commence par la reconnaissance des micro-organismes, médiée par des récepteurs spécifiques exprimés à la surface des macrophages. La phagocytose implique ensuite l'ingestion de particules de plus de 0,5 μm au sein d'une vésicule formée à partir de la membrane plasmique, appelée phagosome (Rosales et Uribe-Querol 2017).

Les phagosomes fusionnent avec les lysosomes pour former des phagolysosomes. Ces derniers constituent les organites microbicides essentiels, dotés de mécanismes complexes permettant la dégradation efficace des micro-organismes (Uribe-Querol et Rosales 2020). Cette dégradation est assurée par des enzymes protéolytiques, et renforcée par un mécanisme appelé explosion oxydative. Cela implique la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et d'oxyde nitrique (NO) (Müllebnier et al. 2018).

Le complexe nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase (NOX), qui génère des espèces réactives de l'oxygène (ROS) comme le superoxyde (O_2^-), est également présent à la membrane du phagolysosome. Le superoxyde se transforme en H_2O_2 , qui est capable de réagir avec les ions Cl^- pour produire de l'acide hypochloreux, un agent antimicrobien extrêmement efficace. L'enzyme myéloperoxydase catalyse cette réaction finale. Par ailleurs, le phagolysosome renferme diverses enzymes hydrolytiques comme les cathepsines, les protéases, les lysozymes et les lipases qui participent à la décomposition des micro-organismes absorbés (Uribe-Querol et Rosales 2020).

1.2.5. Macrophage et *M. tuberculosis*

Le poumon constitue l'entrée principale pour *M. tuberculosis* (Russell et al. 2009). Il existe deux principales populations de macrophages dans le poumon : les macrophages alvéolaires (MA) et les macrophages interstitiels (MI). Les MA sont dérivés des cellules hépatiques fœtales lors de l'embryogenèse et ont la capacité de s'auto-renouveler à l'état d'équilibre (Guilliams et al. 2013). Contrairement aux MA, les MI, dont le rôle est moins bien défini, sont principalement sélectionnés comme dérivés des monocytes lorsqu'ils sont en état d'équilibre (Gibbins et al. 2017).

Les macrophages (MA) phagocytent les bactéries, ce qui déclenche une réponse pro-inflammatoire localisée et favorise le recrutement de cellules mononucléées depuis les vaisseaux sanguins avoisinants. Ces cellules s'agrègent pour former le granulome (Figure 1.5), structure caractéristique de la tuberculose. Par ailleurs, les MA sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12, l'IL-1 β et le TNF- α . L'IL-12 qui sont impliquées dans l'initiation d'une réponse des lymphocytes T helper de type 1 (Th1) (Van Crevel, Ottenhoff, et Van Der Meer 2002).

Après la phagocytose des bacilles, les macrophages forment un phagosome qui fusionne avec le lysosome pour créer le phagolysosome. Toutefois, *M. tuberculosis* a la capacité de bloquer ce mécanisme, ce qui lui permet de survivre dans la vacuole du macrophage pendant des années, transformant ce dernier en une niche où la bactérie peut se multiplier durant une grande partie de son cycle biologique (Mishra et Surolia 2018).

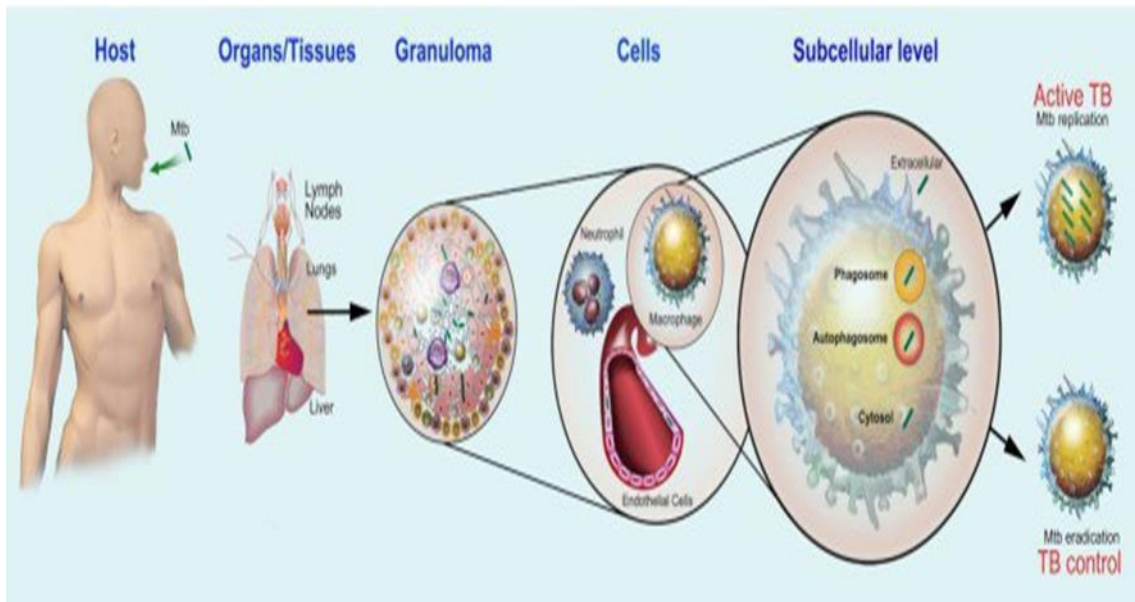


Figure 1.5. Macrophage et *M. tuberculosis* (Bussi et Gutierrez 2019). La tuberculose est essentiellement une infection pulmonaire provoquée par *Mycobacterium tuberculosis*, transmise par l'inhalation de gouttelettes infectieuses en suspension dans l'air. Une fois inhalées, ces particules atteignent les alvéoles pulmonaires, où l'infection peut s'installer. Bien que localisée principalement dans les poumons, le VTT peut également se diffuser vers d'autres tissus. L'établissement de l'infection déclenche une réponse inflammatoire locale, menant à la formation de granulomes, des structures cellulaires organisées composées de macrophages, de cellules épithélioïdes, de granulocytes et de lymphocytes. *Mycobacterium tuberculosis* est capable d'infecter divers types de cellules hôtes, notamment les neutrophiles, les macrophages et les cellules endothéliales. Après internalisation, la bactérie peut persister dans différents compartiments intracellulaires (phagosomes, autophagosomes) et même au cytosol. Bien que l'hôte déploie des réponses immunitaires complexes pour contrôler l'infection, celles-ci sont souvent mises en échec par les mécanismes d'évasion et les facteurs de virulence de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), permettant ainsi la persistance de la bactérie et sa prolifération.

1.3. Vitamine D

1.3.1. Historique

La découverte de la vitamine D a commencé au milieu du XIXe siècle, suite à une apparition d'une grande prévalence du rachitisme chez les enfants des villes par rapport à ceux des campagnes. Une cinquantaine d'années plus tard, Palm a mis en évidence que les enfants vivant dans des régions ensoleillées étaient presque totalement épargnés par cette maladie (Mohr 2009).

En 1920 : Steenbock et Hess démontrent qu'une exposition à la lumière ultraviolette confère aux aliments des propriétés antirachitiques. Parallèlement, l'huile de foie de morue est reconnue comme une solution nutritionnelle efficace pour lutter contre cette maladie.

En 1922 : McCollum isole une substance spécifique à partir de l'huile de foie de morue qu'il nomme « vitamine D » (Jones 2022).

En 1928 : Windaus a reçu le prix Nobel de chimie pour ses travaux sur les stéroïdes et leur relation avec les vitamines (Norman 2012).

Windaus a mené des recherches essentielles ayant permis de clarifier la structure chimique de la vitamine D, notamment celle du calciférol (vitamine D2) et du cholécalciférol (vitamine D3)(Wolf 2004).

En 1967 : Les recherches ont montré que la vitamine D est métabolisée en plusieurs composés actifs. Le principal métabolite, le 25-hydroxyvitamine D3, a été découvert, suivi de l'identification de la forme hormonale active, la 1,25-dihydroxyvitamine D3.

En 1975 à aujourd'hui : La découverte des fonctions cellulaires de la vitamine D a révélé son rôle essentiel dans la régulation de nombreux gènes et dans diverses fonctions physiologiques (Jones 2022).

1.3.2. Définition

La vitamine D est une pro hormone liposoluble de type séco-stéroïde (Kheiri et al. 2018), qui existe sous deux formes principales : la vitamine D2 (ergocalciférol) et la vitamine D3 (cholécalciférol)(Delrue et Speeckaert 2023b). Les formes D2 et D3 ne diffèrent que par leur structure de chaîne latérale. La vitamine D2 possèdent une double liaison C-22-23 supplémentaire et un groupe méthyle C-24 (Figure 1.6). Ces modifications ont peu d'effets significatifs sur leur métabolisme ou leurs actions biologiques (Jones 2022).

La vitamine D peut être obtenue à partir de l'alimentation, des suppléments ou par l'exposition aux rayons ultraviolets solaires (Harrison et al. 2020).

Cette vitamine joue un rôle essentiel dans l'homéostasie du calcium, contribuant au maintien de la santé osseuse. Elle favorise une meilleure absorption intestinale du calcium alimentaire, limite les pertes de calcium dans les urines et mobilise le calcium stocké dans les os (Janoušek et al. 2022).

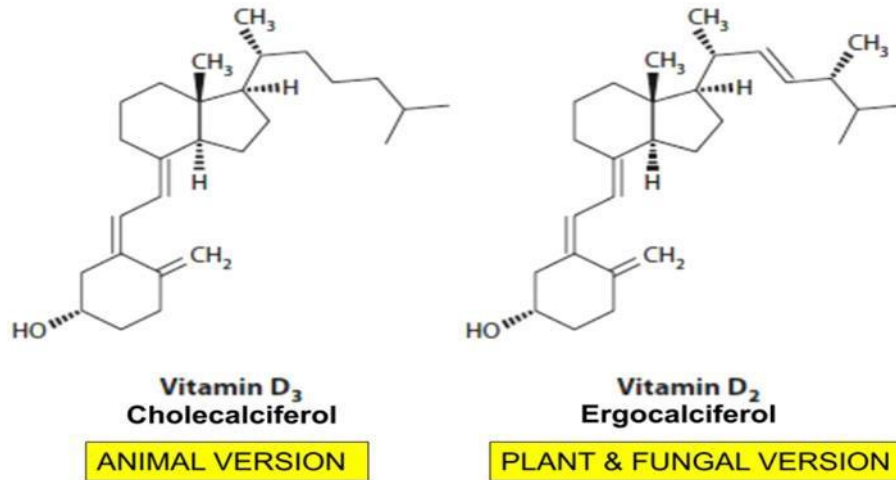


Figure 1.6. Structure chimique de la vitamine D2 et de la vitamine D3 (Jones 2022).

1.3.3. Origine

La vitamine D₂ se trouve dans certains végétaux et champignons exposés à la lumière ultraviolette, alors que la vitamine D₃ est synthétisée dans la peau des humains à partir du 7-déhydrocholestérol ou apportée à partir de consommée l'alimentation via la consommation d'aliments d'origine animale (Pierens et Fraser 2015).

Exemple d'aliments riches en vitamine D (tableau 1.3).

Tableau 3.1. Aliments naturellement riches en vitamine D (Souberbielle 2014).

	Sources	Quantité	Teneur par µg
La vitamine D ₂	Les seules significatives sont les champignons séchés au soleil. Le « champion du monde » est le champignon Shitaké séché	100 g	20 à 25
La vitamine D ₃	Huile de foie de morue	100 g	500
	Saumon, hareng, ou thon sauvage	100 g	15-25
	Saumon d'élevage	100 g	7-10
	Sardines à l'huile en boîte	100 g	7,5
	Huitres	100 g	10
	Truite	100 g	5
	Jaune d'œuf	100 g	2 à 3
	Foie de veau	100 g	0,5
	Laitages ou céréales	100 g ou 100 ml	1,25

1.3.4. Métabolisme

La vitamine D doit être métabolisée dans l'organisme pour produire son métabolite actif. La Vitamine D₂ est produite à partir de l'ergostérol des plantes, des levures et des champignon, sous l'effet des rayons UVB (Clifopoulos 2017). La vitamine D₃ est produite lorsque la peau est exposée aux UVB qui permettent de convertir le 7-déhydrocholestérol (provitamine D₃) en prévitamine D₃, puis en vitamine D₃ (Dattola et al. 2020) via une série d'isomérisations thermiques. La vitamine D est également obtenu par l'absorption intestinale d'aliments enrichis en vitamine D, qu'ils soient naturels ou sous forme de suppléments D₂ et D₃ (Dominguez et al. 2021). Une fois produite, la vitamine D est libérée dans la circulation sanguine, où elle se lie à la vitamin D binding protein (DBP) (DBP, *vitamin D binding protein*) (Figure 1.7) pour être transportée jusqu'au foie (Christakos et al. 2016). Au niveau hépatique, elle subit une hydroxylation pour devenir 25-hydroxyvitamine D (25(OH)D ou calcidiol), principalement par l'action des enzymes CYP2R1 et CYP27A1, appartenant à la famille des cytochromes P450. Ce mécanisme peut également se dérouler dans d'autres tissus selon une régulation de type

autocrine ou paracrine (Dominguez et al. 2021). Enfin, au niveau rénal, le 25(OH)D est transformé en sa forme biologiquement active, la 1,25-dihydroxyvitamine D [$1,25(\text{OH})_2\text{D}$] (calcitriol) via *CYP27B1* (Delrue et Speeckaert 2023b). Le 1,25(OH) $_2$ D active ou supprime la transcription des gènes en se liant au récepteur de la vitamine D (*VDR*) (Ramasamy 2020b).

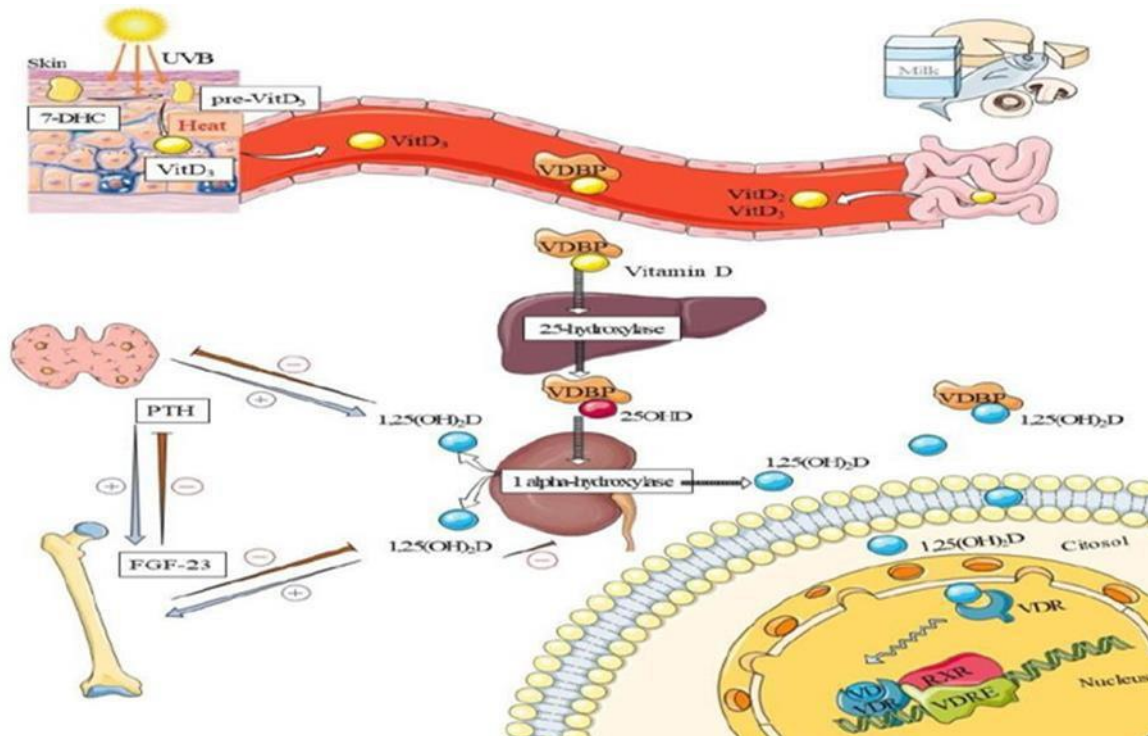


Figure 1.7. Métabolisme et le récepteur de la vitamine D (Silva et Lazaretti-Castro 2022).

1.3.5. Récepteur de la vitamine D

Le récepteur de la vitamine D (*VDR*, *vitamin D receptor*) fait partie de la superfamille des récepteurs hormonaux nucléaires (nVDR) et fonctionne comme un facteur de transcription activé par un ligand (action génomique) (Silva et Lazaretti-Castro 2022). Initialement découvert dans les tissus classiques, ce récepteur joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie du calcium et du phosphate, en agissant principalement au niveau de l'intestin, des os, des reins et des glandes parathyroïdes. Des recherches plus récentes ont montré que le récepteur de la vitamine D (*VDR*) est également exprimé dans divers types cellulaires ne participant pas directement à la régulation calcique, tels que les kératinocytes cutanés et les fibroblastes du derme (Pike et al. 2017).

-Le *VDR* est d'abord activé par son hormone apparentée et forme un complexe *VDR*-calcitriol [$1,25(\text{OH})_2\text{D}$].

-l'hétérodimérisation avec le RXR (Le récepteur d'acide rétinoïque) (figure 1.7).

- Le complexe forme par le calcitriol, le VDR et le RXR interagit avec l'élément VDRE dans les régions promotrices des gènes cibles, recrutant des coactivateurs ou corépresseurs pour moduler l'expression de l'ARNm et réguler des fonctions variées (Jeon et Shin 2018b).

De plus, le VDR membranaire (mVDR), présentant des similitudes avec le VDR nucléaire (nVDR), peut jouer un rôle dans des actions rapides non liées à la régulation des gènes (action non génomique) (Mizwicki et Norman 2009), et en déclenchant une série de réactions de signalisation cellulaire impliquant la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase C (PKC). Ces voies de signalisation aident à l'entrée du calcium extracellulaire dans les cellules ou stimulent la libération de calcium à partir des réserves intracellulaires dans le réticulum endoplasmique (RE).

1.3.6. Fonctions biologiques de vitamine D

1.3.6.1. Vitamine D et neurologie

La vitamine D joue un rôle dans la santé du système nerveux en agissant par l'intermédiaire de ses récepteurs répartis dans diverses zones du cerveau (Zmijewski 2019). Elle intervient dans la synthèse de plusieurs neurotransmetteurs (l'acétylcholine, la dopamine et le GABA) et influence la production de facteurs neurotrophiques, notamment le facteur de croissance nerveuse (NGF), pour la survie et au bon fonctionnement des neurones (Moretti, Morelli, et Caruso 2018).

1.3.6.2. Vitamine D et cycle cellulaire

La vitamine D stoppe la division cellulaire (phase G0-G1) en activant des inhibiteurs kinases dépendantes des cyclines (CDKI) comme p27kip1 et p21WAF1/CIP1 (Umar, Sastry, et Chouchane 2018b).

1.3.6.3. Vitamine D et apoptose

La vitamine D est capable de moduler l'activité de plusieurs médiateurs essentiels impliqués dans le processus d'apoptose au sein de divers types de cellules cancéreuses. Dans le carcinome épidermoïde humain, le calcitriol active la voie caspase 8/10-caspase 3 et réduit les protéines anti-apoptotiques comme l'inhibiteur cellulaire de la protéine 1 de l'apoptose (c-IAP1) et l'inhibiteur lié à l'X de la protéine de l'apoptose (XIAP) (Ma et al. 2013). Dans la leucémie myéloïde chronique, le 1,25(OH)2D3 réduit lymphome à cellules B 2 (BCL2) et lymphome à cellules B-extra large (BCL-XL) (anti-apoptotique) et en augmentant protéine Bcl-2 associée à X (BAX) et cycline-dépendante kinase inhibiteur 1 (p21) (pro-apoptotique) pour favoriser l'apoptose (Kizildag, Ates, et Kizildag 2010, 21).

1.3.7. Vitamine D et régulation immunitaire

1.3.7.1. Vitamine D et l'immunité innée

La vitamine D intervient de manière cruciale dans la régulation de la production des peptides antimicrobiens (AMP), notamment la cathélicidine et la β -défensine 2. La production de cathélicidine est stimulée par le complexe $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR dans divers types de cellules, notamment : neutrophiles, monocytes, macrophages, cellules myéломonocytaires et kératinocytes (T.-T. Wang et al. 2004). Par ailleurs, la production de la β -défensine 2 est induite par l'action du complexe $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR dans certaines lignées cellulaires humaines telles que SCC25, Calu-3 et les kératinocytes. Cette induction est renforcée en présence de l'interleukine-1 (IL-1) (Liu et al. 2009).

Les cellules dendritiques (DC) sont des cellules présentatrices d'antigènes (APC) du système immunitaire inné. Le $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ maintient l'état immature des DC, par la réduction de l'expression des molécules de co-stimulation (CD40, CD80, CD86) et du CMH-II, et diminue leur capacité à activer les cellules T alloréactives (Penna et Adorini 2000).

Enfin, la vitamine D participe à l'établissement de la tolérance immunitaire en inhibant la production d'IL-12 et en augmentant celle d'IL-10, ce qui entraîne une réduction de l'activité des lymphocytes Th1 et favorise l'induction des cellules T régulatrices (Treg) (Umar, Sastry, et Chouchane 2018b).

1.3.7.2. Vitamine D et immunité adaptative

La vitamine D intervient dans la différenciation des cellules T CD4⁺ en sous-types (Th1, Th2, Th17, Th22, Treg), et leur sécrétion cytokinique :

- Le $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ supprime la sécrétion d'IFN- γ par les cellules Th1 et diminue l'expression des cytokines IL-17 et IL-22 (Jeffery et al. 2009).
- La vitamine D3 stimule principalement la différenciation des cellules Th2 en augmentant la production d'IL-4 (Bartels et al. 2007).
- Lorsque les cellules B deviennent hyperactives, le $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ intervient pour réguler la production excessive d'immunoglobulines, grâce à divers mécanismes d'action notamment, l'empêchement de la formation des plasmocytes et le déclenchement de l'apoptose des cellules B activées ainsi que des plasmocytes. De plus, il limite l'activation des cellules B induite par les cytokines en modulant l'action des cellules T auxiliaires (Charoenngam et Holick 2020).

1.4. Réaction en chaîne par polymérase

1.4.1. Définition

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) constitue une méthode essentielle en biologie moléculaire. Elle a été proposée pour la première fois en 1983 par Kary Mullis aux États-Unis et officiellement mise au point en 1985 (Yang et al. 2022).

La PCR est une technique réalisée *in vitro* qui permet d'amplifier massivement un fragment d'ADN spécifique, de taille et de séquence bien déterminées, à partir d'un échantillon complexe. Elle repose sur l'amplification enzymatique d'un segment d'ADN délimité par deux amorces Oligo nucléotidiques, fixées sur des brins opposés de la séquence cible. En quelques heures seulement, cette méthode permet d'obtenir plusieurs millions de copies de l'ADN recherché (Ghannam et Varacallo 2025).

1.4.2. Acteurs de la PCR

- **ADN matrice** : L'ADN est l'élément le plus important dans cette opération. La matrice d'ADN contient la région d'intérêt spécifique pour l'amplification (Ghannam et Varacallo 2025).
- **L'ADN polymérase** : l'enzyme clé qui assemble les nucléotides entre eux, permettant ainsi la synthèse du produit PCR.
- **Les nucléotides** sont les unités de base de l'ADN, composées des quatre bases azotées : adénine (A), thymine (T), cytosine (C) et guanine (G). Ils constituent les éléments essentiels utilisés par l'ADN polymérase pour la synthèse du brin d'ADN au cours de la réaction PCR.
- **Les amorces** : Ce sont de courts segments d'ADN avec une séquence spécifique, complémentaire de la région cible. Elles servent de point de départ à l'ADN polymérase pour l'élongation et l'amplification de l'ADN (Garibyan et Avashia 2013).

1.4.3. Etapes de la PCR

La technique de PCR se déroule en trois étapes fondamentales, où les produits obtenus à chaque étape servent de point de départ essentiel pour la suivante (Figure 1.8).

La PCR est réalisée par un mélange d'extrait d'ADN, de Taq polymérase, d'amorces et de quatre désoxyribonucléosides triphosphates (dNTPs) dans des tubes à puits placés dans un thermocycleur.

1.4.3.1. La dénaturation

La **dénaturation** est la première étape de la PCR et consiste à séparer les deux brins d'ADN par élévation de la température, généralement à **94 °C**. À cette température, les liaisons

hydrogène maintenant les brins complémentaires ne résistent plus, entraînant la conversion de l'ADN double brin en **ADN simple brin** (monocaténaire) (Powledge 2004)

1.4.3.2. Hybridation

La deuxième étape, appelée hybridation, se déroule à une température généralement comprise entre 40 et 70 °C, correspondant à la température d'hybridation des amorces. La diminution de la température favorise la reformation des liaisons hydrogène, permettant aux brins complémentaires de s'apparier. Les amorces, courtes séquences monocaténares spécifiques, s'hybrident plus facilement aux régions flanquantes de l'ADN cible que les longs brins d'ADN matriciel.

1.4.3.3. Elongation

L'élongation constitue la troisième étape de la PCR et s'effectue généralement à une température optimale de 72 °C. Lors de cette phase, la **Taq polymérase** synthétise le brin complémentaire en incorporant les **dNTPs** présents dans le mélange réactionnel. L'enzyme progresse le long du brin matrice, assemblant les nucléotides de manière spécifique afin de former une nouvelle copie de l'ADN cible (Kadri 2020).

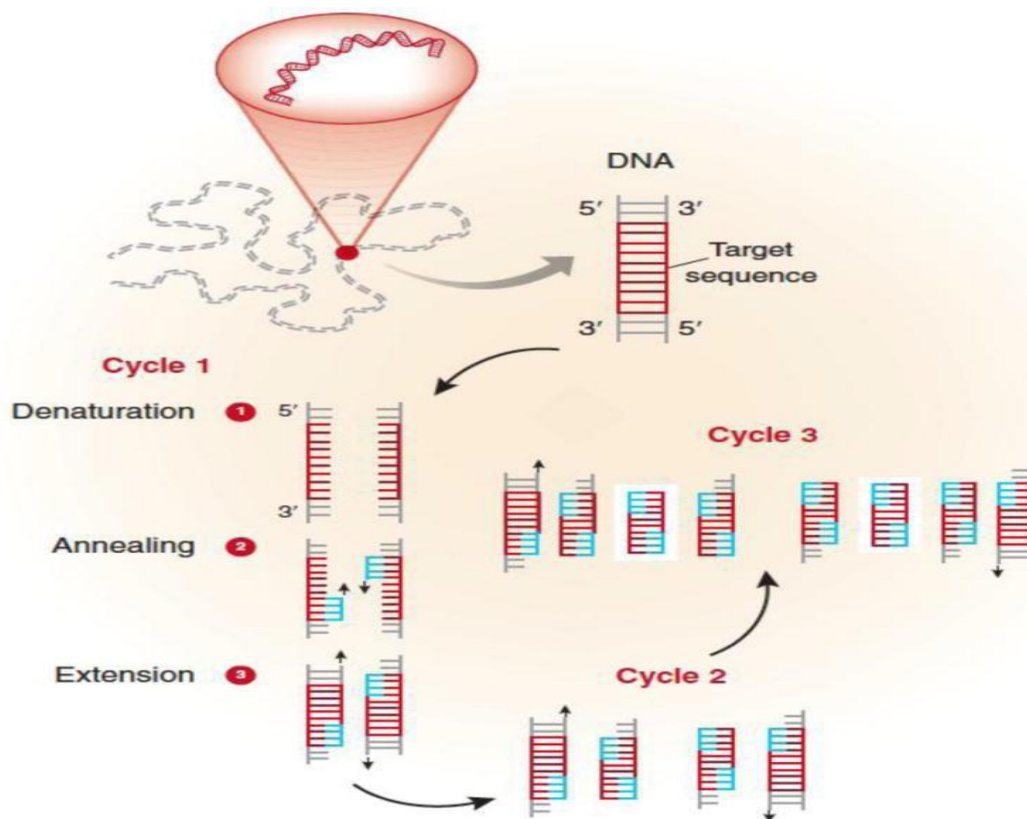


Figure 1.8. Les étapes de la réaction en chaîne par polymérase (PCR) (Garibyan et Avashia 2013).

1.4.4. Types de la PCR

1.4.4.1. PCR qualitative

La PCR qualitative est une technique efficace. Elle permet de détecter la présence ou l'absence d'un fragment d'ADN spécifique. La PCR qualitative est réalisée à des fins de clonage ou pour identifier un agent pathogène (Garibyan et Avashia 2013).

1.4.4.2. PCR quantitative

La PCR quantitative permet de quantifier avec précision la quantité d'ADN ou d'ARN spécifique présent dans un échantillon biologique. Cette technique repose sur la détection d'un signal fluorescent, dont l'intensité est proportionnelle à l'amplification du produit de PCR. Son utilisation nécessite un thermocycleur équipé d'un système de lecture optique capable d'analyser l'émission de fluorescence (Kadri 2020).

1.4.5. Analyse des résultats du PCR

Deux principales techniques permettent de visualiser les produits de la PCR : (1) la coloration de l'ADN amplifié à l'aide de colorants chimiques, comme le bromure d'éthidium, qui s'intercale entre les deux brins d'ADN (Garibyan et Avashia 2013); ou (2) le marquage des amorces ou des nucléotides avec des fluorophores avant l'amplification. Cette approche plus récente permet l'intégration directe de marqueurs fluorescents dans les produits de PCR (Khehra, Padda, et Swift 2025). La méthode la plus couramment utilisée pour analyser ces produits reste l'électrophorèse sur gel d'agarose. Elle permet de séparer les fragments d'ADN en fonction de leur taille et de leur charge, tout en offrant un moyen simple de vérifier leur présence et d'estimer leur taille. Pour cette estimation, on utilise des marqueurs moléculaires, constitués de fragments d'ADN de tailles connues, déposés sur le gel en parallèle aux échantillons (Wittmeier et Hummel 2022).

1.5. Problématique

Les macrophages jouent un rôle essentiel dans la défense contre les infections bactériennes. Dès qu'une bactérie pénètre dans l'organisme, les macrophages la reconnaissent, l'absorbent (phagocytose) et la détruisent à l'aide des enzymes. La vitamine D joue un rôle clé dans la réponse immunitaire des macrophages lors des infections. Elle favorise l'expression du gène *CYP27B1*, qui permet la conversion de la vitamine D en sa forme active ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$) au sein des macrophages. Cette vitamine D active induit ensuite l'expression du gène *VDR* (récepteur de la vitamine D), permettant l'activation de gènes antimicrobiens tels que cathélicidine. Dans ce travail, nous allons nous intéresser sur l'étude de l'effet de la vitamine D sur l'expression des gènes *VDR* et *CYP27B1* au cours de l'infection par *M. tuberculosis*.

1.5.1. Objectif

Conception d'amorces des gènes *VDR* et *CYP27B1* afin de mesurer par PCR leur expression par les macrophages au cours de l'infection

But

Le but de cette étude est d'analyser l'effet de la vitamine D sur l'expression des gènes *VDR* et *CYP27B1* dans les macrophages au cours de l'infection par *M. tuberculosis*.

Chapitre 2. Matériel et méthodes

2.1. Conception d'amorce

2.1.1. Définition

La conception d'amorces constitue une étape essentielle pour le succès des expériences de biologie moléculaire impliquant la PCR (Hung et Weng 2016). Elle consiste à créer de courtes séquences de nucléotides permettant l'amplification de régions géniques ciblées par PCR (Septiyanto et al. 2022).

Une conception inadéquate des amorces peut entraîner l'absence d'amplification ou la génération de produits non spécifiques (Hung et Weng 2016).

2.1.1 Critère de choix d'amorces

Plusieurs paramètres doivent être respectés lors du choix des amorces. Les plus importants sont les suivants :

2.1.1.1 Longueur de l'amorce

La longueur de l'amorce joue un rôle crucial dans la réussite de la PCR, car elle influence la spécificité, la température de fusion et le temps d'hybridation. En général, une longueur comprise entre 18 et 30 bases est considérée comme optimale pour la plupart des applications. Des amorces trop courtes risquent de provoquer une amplification non spécifique, tandis que des amorces plus longues offrent une meilleure spécificité, mais augmentent le risque de formation de structures secondaires telles que les boucles en épingle à cheveux (Álvarez-Fernández 2013).

2.1.1.2 Température de fusion des amorces

La température de fusion (T_m) des amorces joue un rôle crucial dans la spécificité de la PCR. Pour garantir des résultats fiables, elle est généralement utilisée dans une plage allant de 55 °C à 60 °C. De plus, la différence de T_m entre les deux amorces d'une même paire ne devrait pas excéder 2 à 3 °C (Apte et Daniel 2009).

2.1.1.3 Teneur en GC de l'amorce

La teneur en GC d'une amorce, correspondant au pourcentage de guanines et de cytosines qu'elle contient, influence fortement ses propriétés d'hybridation. Une proportion optimale se situe généralement entre 40 % et 60 %. Il est important que les amorces directe et inverse présentent une teneur en GC comparable, car cela affecte indirectement les conditions d'hybridation et la stabilité de la PCR (Chuang, Cheng, et Yang 2013).

2.1.1.4 L'extrémité 3'

L'extrémité 3' des amorces devrait contenir une base G ou C afin de renforcer leur fixation, car les appareils GC sont thermodynamiquement plus stables que les appareils AT (Lorenz 2012). Il est également conseillé d'éviter les homooligomères (comme -AAAAAA-) ainsi que les répétitions de dinucléotides (comme -CACACA-), notamment à l'extrémité 3' des amorces. Il est également essentiel que les extrémités 3' des amorces ne soient pas complémentaires entre elles, et qu'une amorce ne contienne pas de séquences internes capables de s'apparier avec sa propre extrémité 3' (Chuang, Cheng, et Yang 2013).

2.1.1.5 Spécificité

La spécificité d'une amorce en PCR est liée, au moins en partie, à sa longueur, qui influence sa capacité à se fixer précisément et uniquement sur la séquence cible de l'ADN. Une amorce bien conçue doit se lier uniquement à la région d'ADN à amplifier afin d'éviter toute amplification non spécifique (Joshi et Deshpande 2011).

2.1.2 Logiciels et base de données utilisés dans le travail

2.1.2.1 NCBI

Le Centre national d'information sur les biotechnologies (NCBI) constitue une plateforme d'archivage qui permet un accès libre à une vaste quantité de données et de publications liées aux séquences biologiques. Les chercheurs du NCBI y analysent les données soumises par les utilisateurs, notamment les annotations de gènes et de polymorphismes nucléotidiques (SNP), et mettent à disposition des outils pour l'alignement des séquences (Rangwala et al. 2021).

2.1.2.2 Ensembl

Ensembl se présente sous la forme d'un site web interactif, de fichiers plats, ainsi que d'un logiciel open source complet et facilement portable pour l'analyse et la manipulation des génomes. L'ensemble des données est mis à disposition sans restriction, et le code source est entièrement accessible au public (Birney et al. 2004).

La plateforme Ensembl centralise et analyse des données génomiques publiques provenant à la fois d'eucaryotes et de procaryotes. Elle prend en charge un large éventail d'applications, allant de la recherche fondamentale aux domaines clinique et agricole. Les données disponibles incluent notamment les séquences génomiques, les annotations génétiques (modèles de gènes, prédictions fonctionnelles, variants génétiques, etc.) (Dyer et al. 2025).

2.1.2.3 Primer Blast

Primer-BLAST est un outil bio-informatique qui permet de concevoir de nouvelles amorces spécifiques à une séquence cible tout en évaluant la spécificité de celles déjà existantes. Il offre également la possibilité de positionner les amorces en tenant compte de la répartition exons/introns et d'exclure les sites contenant des polymorphismes mononucléotidiques (SNP). Par ailleurs, Primer-BLAST impacte individuellement les amplicons générés par chaque amorce (Ye et al. 2012).

2.2 Gènes étudiés

2.2.1 *CYP27B1*

2.2.1.1 Généralité

Le gène *CYP27B1* (Cytochrome P450, famille 27, sous-famille B, membre 1), situé sur 12q14.1 (figure 2.1), et composé de neuf exons, code pour l'enzyme 25-hydroxyvitamine D-1 α hydroxylase (Demir et al. 2015). Cette enzyme est classée dans la famille des enzymes mitochondriales du cytochrome P450 contenant 508 acides aminés, avec une masse moléculaire d'environ 56,5 kDa (Zalewski et al. 2016). Le *CYP27B1* intervient dans de nombreuses réactions, notamment en convertissant le calcidiol, précurseur de la vitamine D, en sa forme active, le calcitriol (Mahajan et al. 2021). Il est principalement exprimé dans le tubule proximal des reins, mais également dans de nombreux tissus cibles de la vitamine D, bien qu'à des niveaux plus faibles (Hendrix et al. 2004).

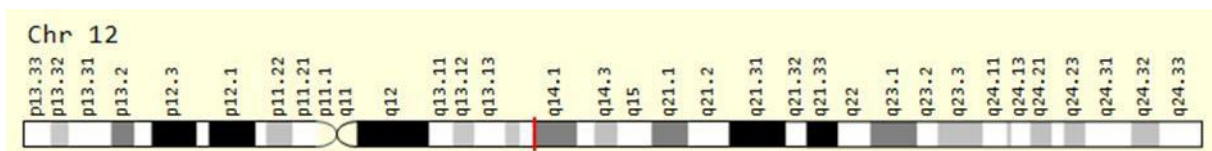


Figure 2.1. Localisation de gène *CYP27B1* sur le chromosome 12 humain d'après Genecards Reference.

2.2.1.2 Séquence du gène *CYP27B1*

La conception des amorces consiste dans un premier temps à extraire la séquence du gène *CYP27B1* de la base de données 'Ensembl' à partir le site internet (ensembl.org) (figure 2.2, 2.3, 2.4, 2.5).

Ensembl BLAST/BLAT | VEP | Outils | BioMart | Téléchargements | Aide et documentation | Blog

Outils
[Tous les outils](#)

BioMart >
Exportez des ensembles de données personnalisés depuis Ensembl avec cet outil d'exploration de données

BLAST/BLAT >
Recherchez votre séquence d'ADN ou de protéines dans nos génomes

Prédicteur d'effet de variante >
Analysez vos propres variantes et prévoyez les conséquences fonctionnelles des variantes connues et inconnues

Recherche

Humain pour CYP27B1 **Aller**

par exemple [BRCA2](#) ou [rat 5:62797383-63627669](#) ou [rs699](#) ou [maladie coronarienne](#)

Tous les génomes
-- Sélectionnez une espèce --

Génomes préférés

Humain
GRCh38.p14

Figure 2.2. Plateforme de la base de données Ensembl. (1) Spécifier l'espèce Humaine puis (2) inscrire le nom du gène *CYP27B1* ensuite (3) cliquer sur Aller pour afficher les résultats (encadrer en rouge).

Ensembl BLAST/BLAT | VEP | Outils | BioMart | Téléchargements | Aide et documentation | Blog

Nouvelle recherche

Sélection actuelle :
< toutes les espèces
Recherche uniquement humaine

Restreindre la catégorie à :

Gène 2
Transcription 11
Variante 5
Phénotype 1
GeneTree 1

Par page :
10 25 50 100

Mise en page:

Recherche uniquement CYP27B1

20les résultats correspondent au CYP27B1 lorsqu'ils sont limités à espèce : Humain

Veuillez-vous dire...

CYP27B1 (gène humain)
ENSG00000111012 12:57762334-57768986-1
Cytochrome P450 famille 27 sous-famille B membre 1 [Source : Symbole HGNC ; Acc. : HGNC : 2606]
CYTOCHROME P450, SOUS-FAMILLE XXVIII, POLYPEPTIDE 1 ; CYP27B1 [*609506] (enregistrement du gène MIM ; description : CYTOCHROME P450, SOUS-FAMILLE XXVIII, POLYPEPTIDE 1 ; CYP27B1 ; 25-@HYDROXYVITAMINE D3-1-ALPHA-HYDROXYLASE ; 1-@ALPHA-HYDROXYLASE ; P450C1-ALPHA.) est une référence externe correspondant au gène ENSG00000111012

Tableau des variantes • Phénotypes • Emplacement • Références externes • Règlement • Orthologues • arbre génétique

CYP27B1-208 (transcription humaine)
ENST00000713544 12:57762334-57767078-1
Cytochrome P450 famille 27 sous-famille B membre 1 [Source : Symbole HGNC ; Acc. : HGNC : 2606].
Emplacement • Références externes • séquence d'ADNc • Exons • Tableau des variantes • Séquence de protéines • Population • Résumé des protéines

Figure 2.3. Résultats de la recherche du gène *CYP27B1*. Cliquer sur le premier résultat de recherche en vérifiant que c'est bien le gène désiré et qui correspond à l'espèce humaine (encadrer en rouge).

Ensembl BLAST/BLAT | VEP | Outils | BioMart | Téléchargements | Aide et documentation | Blog

Humain (GRCh38.p14) ▼

Emplacement : 12:57,762,334-57,768,986 Gène : CYP27B1

Gène : CYP27B1 ENSG00000111012

Description cytochrome P450 famille 27 sous-famille B membre 1 [Source : Symbole HGNC ; Acc. : [HGNC : 2606](#)]

Synonymes de gènes CYP1, P450C1, PDDR, VDD1

Emplacement [Chromosome 12 : 57 762 334-57 768 986](#) brin inverse.
GRCh38:CM000674.2

À propos de ce gène Ce gène possède 10 transcrits ([variantes d'épissage](#)), [192 orthologues](#) , [3 paralogues](#) et est associé à

Transcriptions [Afficher le tableau de transcription](#)

Résumé

Nom [CYP27B1](#) (symbole HGNC)

CRINIERE Ce gène contient MANE Select [ENST00000228606](#) , [ENSP00000228606](#)

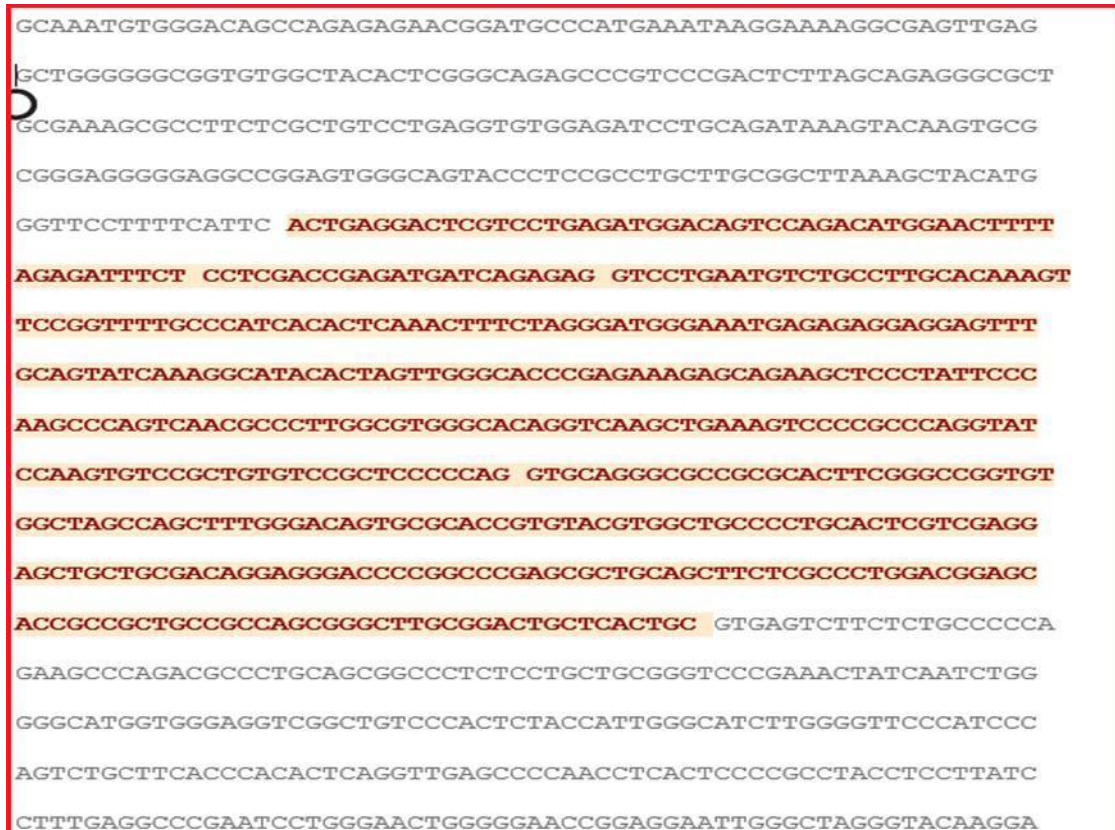
UniProtKB Ce gène possède des protéines qui correspondent aux identifiants UniProtKB suivants : [Q15528](#)

Figure 2.4. Caractéristiques du gène *CYP27B1*. La plateforme de la base de données montre les différentes caractéristiques du gène *CYP27B1*, ensuite il faut cliquer sur « Séquence » pour afficher la séquence du gène (encadrer en rouge).

```
>chromosome : GRCh38 : 12 : 57761734 : 57769586 : -1
TGCCTAC GTGCTAAGAGTTGGG GTGAGTTGGGATCGGAGGGATGATGGGGTGAGTGGCCT
ACTCAGGGGCCCTTCACTAAGAATTCAGTGGGGGTGCATTTAGGGACTCACACCACCACT
TCCTTCATCTGGCTGCTGACGTTGCATGCAGCCTCCTGTCTAG GGTGATTTTGCCTATGC
AG GGGCTGGTGTATACCATAACCGATGTGCTGGAGCTACACGACTGGATGTGCACTCATT
TCGAAGAGCACCCACTGTTTGAGCGTGTGCCTCTGGAGGACCT G GTGAGTAGGGGACCTA
GAGGAGGTGGAGGCCCTTTCCAGAGTGGTTCGTATTTGGACTTAACTCAGTGCCAGGAG
GATGGGATAGGTGTCTAAGGGCCAGGGGCAGTCTGAACAGTGGGCAAGGACTTATTGGAC
CCTTCCTTCTCCAG AGTGAAGACCCCGTTGTGGGACATCTAGGCACCTCAACTGAGGAG
GGGAAGAAAGTTCTACGTAATGGAGGGAAGAATTTCCAGCCATCTTCCGAAGAATAC AA
GATCCCCTCCTCCAGGCAGTGACCTCCCAAACCAGCCTGCCTGGTCACTGACTGCTTACT
CTACCTTAGCTGGACCTCGTCTCCCAGGGATTAGAGAAAAGAGCAGGAGTCTGGGTCTT
CCCAGTTGAGACTGCTGGAGCTGAGACACAGTACTCTCTTAAAGAA GTGGGGGACTGCC
CAGGGCAGAACCCTGCTGTTTCATGACTACCCCTGCTCCTCTCACCTTGTCCCTCCAC
TGCCAAACAGAAAACAAGCAGCTGACTGAGATGGTCAAAGGACTTTGGACCATAGGGGAT
CTTTGGAAGGCTGTGGGGTCTTGCTCTTCTTAGCACTCCTTTCTCCTTGTGAGATCTCT
CCTCAGCTGGAATGAATGTAGTCCATCTAAACTGCTTGCTAGGCTC AATTACCACTT
CTGTTTGTCTTGTGGATCCTGGGATAACATGTATATGTGTACACA TGCCTATTCTGCCAT
TTCTCAGGAAAGGGTGGAGTATGTATCATATGCCTTCTACCATCCTCCTGTCCTCTCCCT
GCGTAAGACTTGACCTGGGGAATCTGTGTTCCCTAA GTGTTGTCTCTGGAGAGTCTTGG
GAAGGTGTGGGGTGGAGACCTCTCCTTTTTTACATTGACCTTCAATTCCAGAAGTTCA
GAGCTAGCTGACTGGCACAGAGCCTGATAGAGTTGGCAGTGGGGAATGAGGGAGTAAGGAG
CAGAGAGGAAAGTGTGGGAGATTCTTTTATTTTAAATTTTATAGAGACAGGCCCTCTC
TCTGTTGCCTAGGCTGGAGTGCAGTGGTACAATCATAACTCACTGCAGCCTTGACCTCCC
GGGCTCATGTAATCCACCTCAGCCTCTCAAGGCACTACAGGCATACGCCACCATGCGCTGG
CTAATTTTGTATTTTGTAGAGACAGTTCCACTATGTTGCCAGGCTGGTCTCAGACT
CCTGAGCTCAAGCAGTCTGCCCACCTTAGCCTCCCAAAGTGTTGGGATTACAGTCATGAG
CTGCCGTGCCAGCCTAATTTTAAACTTCTTCTGTAGAGACAGTCTTGCTATGTTGCTC
AAGCTTGTCTCAACCTCCTGGCCTCATGCCATCCTCCTGCCTCAGCCTCCCAAAGTGCTG
GGATTATAGGCATGAGCCACCACAGGATTCTGAGGCTAAAAGTAGAAAGGAGCTGCTAAC
```

Figure 2.5. La séquence du gène *CYP27B1* depuis la plateforme « Ensembl ». Il faut sélectionner une partie de la séquence et la copier sur un document Word. Les séquences codantes (Exons) sont représentées en rouge et les séquences non codantes (Introns) sont représentées en noir.

Pour faciliter la recherche des amorces, il est nécessaire de sélectionner une séquence située en amont de l'exon ainsi qu'une séquence en aval, afin d'encadrer la région d'intérêt (dans ce cas nous choisissons l'exon 4 (figure 2.6)).



```
GC AAA TGT GGG ACAG CCAG AGAG AACGG ATGCC CATG AAATA AGG AAAAG GCG AGTTG AGT
GCT GGG GGG GCG GTGT GGG TACT ACTCG GGCAG AGCCCG TCCCG ACTCTT AGCAG AGGGCG CT
GCG AAAG CGCCTT CTCG CTGT CCTG AGGTGT GGGAG ATCCTGC AGATAA AGTACA AGTGCG
CGGGAG GGGGAG GCGGAG TGGGCAG TACCCTCC GCGCTG CTTGCG GCTTAA AGCTACATG
GGTTCCTTTTTCATTC ACTGAG GACTCGT CCTGAG ATGGAC AGTCCAG ACATGGA ACTTTT
AGAGATTTCT CCTCG ACCGAG ATGATCAG AGAG GTCCTGA ATGTCTGC CTTGCACAAAGT
TCCGGT TTTTGCC CATCAC ACTCAA ACTTTCTAG GGATGGG AAATGAG AGAGGAGGAGTTT
GCAGTATCAA AGGCATACACTAG TTGGGCACCCGAG AAAGAGCAGAAGCTCCCTATTCCC
AAGCCCAGTCAA CGCCCTTGGCGTGGGCACAGGTCAAAGCTGAAAGTCCCCGCCCAGGTAT
CCAAGTGTCCGCTGTGTCCGCTCCCCCAG GTGCAGGGCGCCGCGCAC TTGGGGCCGGTGT
GGCTAGCCAGCTTTGGGACAGTGGCGACCGTGTACGTGGCTGCCCCTGCACTCGTTCGAGG
AGCTGCTGCGACAGGAGGGACCCCGGCCCGAGCGCTGCAGCTTCTCGCCCTGGACGGAGC
ACCGCCGCTGCCGCCAGCGGGCTTGCGGACTGCTCACTGC GTGAGTCTTCTCTGCCCCCA
GAAGCCCAGACGCCCTGCAGCGGCCCTCTCCTGCTGCGGGTCCCGAAACTATCAATCTGG
GGGCATGGTGGGAGGTGCGCTGTCCCACTCTACCATTGGGCATCTTGGGGTTCCCATCCC
AGTCTGCTTCACCCACACTCAGGTTGAGCCCCAACCTCACTCCCCGCCTACCTCCTTATC
CTTTGAGGCCCGAATCCTGGGAACTGGGGGAACCGGAGGAATTGGGCTAGGGGTACAAGGA
```

Figure 2.6. La séquence d'intérêt (exon 4)

2.2.1.3 Outil Primer BLAST

Nous avons utilisé l'outil Primer blast à partir du centre national de l'information biotechnologique (NCBI) « www.Ncbi.nlm.nih.Gov » pour concevoir les amorces spécifiques au gène *CYP27B1*. Les figures 2.7, 2.8, 2.9 et 2.10 représentent les étapes à suivre pour l'utilisation de cet outil.



Figure 2.7. Base de données NCBI

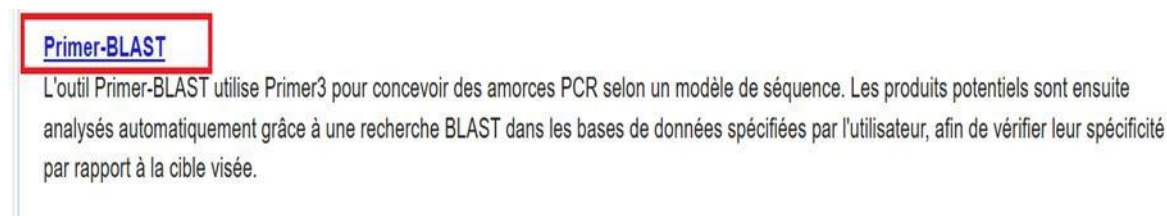


Figure 2.8. Outil Primer Blast

Commencez par copier la séquence encadrée (exon 4) et la coller dans la zone « FASTA ». Ensuite, supprimez les intervalles non séparables présents à l'intérieur de l'amorce.

Figure 2.9. Analyse de la séquence d'intérêt par le Primer blast. On détermine les amorces sens et antisens (Forward et Reverse primer).

Ensuite, nous avons sélectionné certaines caractéristiques afin d'obtenir nos résultats.

Figure 2.10. Paramètres de vérification de la spécificité des paires d'amorces. Faire défiler la page en bas, puis (1) sélectionner la case où c'est écrit « RefSeq mRNA » et choisir « Genomes for selected organisms », ensuite (2) vérifier l'espèce que c'est bien « Homo sapiens », et après (4) cliquer sur « Get Primers » pour afficher les résultats.

2.2.2. VDR

2.2.2.1. Généralité

Le gène *VDR* est localisé sur le bras long du chromosome 12 (figure 2.12), précisément en 12q13.11 (Fetahu, Hãbaus, et Kãjllay 2014), et s'étend sur une région d'environ 63,5 kilobases (kb). Il code une protéine de 427 acides aminés, qui agit comme un facteur de transcription nucléaire activé par la vitamine D (Andraos et al. 2011). Ce gène comprend 12 exons, qui sont des segments contenant l'information génétique pour produire la protéine. La régulation de l'expression du gène *VDR* est influencée par des facteurs à la fois génétiques et environnementaux (Saccone, Asani, et Bornman 2015). Parmi les facteurs environnementaux majeurs figurent l'apport alimentaire, l'exposition aux rayonnements solaires (UVB), les infections, ainsi que la pollution (Agarwal 2002). D'autres déterminants essentiels incluent la disponibilité du précurseur de la vitamine D, ainsi que la synthèse et l'activité biologique du ligand, c'est-à-dire la forme active de la vitamine D (Andraos et al. 2011).



Figure 2.11. Localisation de gène *VDR* sur le chromosome 12 humain d'après Genecards Reference.

2.2.2.2. Séquence du gène *VDR*

La première étape de la conception des amorces consiste à extraire la séquence du gène *VDR* à partir de la base de données Ensembl (figure 2.13,2.14,2.15).

The screenshot shows the Ensembl website interface. At the top, there's a navigation bar with links like BLAST/BLAT, VEP, Outils, BioMart, Téléchargements, Aide et documentation, and Blog. Below this, a search bar contains the text 'Recherche uniquement VDR'. To the left, there's a sidebar with filters: 'Sélection actuelle : < toutes les espèces', 'Recherche uniquement humaine', and 'Restreindre la catégorie à :'. The main content area displays search results for 'VDR (gène humain)'. The first result is highlighted with a red box and contains the following information:
- Gene ID: ENSG00000111424, coordinates 12:47841537-47943048:-1
- Description: Récepteur de la vitamine D [Source : Symbole HGNC ; Acc. : HGNC : 12679]
- Synonyms: RÉCEPTEUR DE LA VITAMINE D ; VDR [*601769] (enregistrement du gène MIM ; description : RÉCEPTEUR DE LA VITAMINE D ; VDR ; RÉCEPTEUR DE LA 1,25-DIHYDROXYVITAMINE D3 ; RÉCEPTEUR DE L'HORMONE VITAMINE D.) est une référence externe correspondant au gène ENSG00000111424
- Links: Tableau des variantes, Phénotypes, Emplacement, Références externes, Règlement, Orthologues, arbre génétique
Below this, two other results are visible: 'VDR-202 (transcription humaine)' and 'VDR-206 (transcription humaine)', both with their respective gene IDs and descriptions.

Figure 2.12. Résultats de la recherche du gène *VDR*. Cliquer sur le premier résultat de recherche en vérifiant que c'est bien le gène désiré et qui correspond à l'espèce humaine (encadrer en rouge).

The screenshot shows the detailed view of the VDR gene in the Ensembl browser. The top bar indicates 'Humain (GRCh38.p14)' and 'Gène : VDR'. The left sidebar shows a navigation menu with categories like 'Affichages basés sur les gènes', 'Résumé', 'Séquence', 'Génomique comparative', 'Ontologies', 'Variation génétique', and 'Chemin'. The 'Séquence' category is highlighted with a red box. The main content area displays the following information:
- Gene ID: VDR ENSG00000111424
- Description: récepteur de la vitamine D [Source : Symbole HGNC ; Acc. : HGNC : 12679]
- Synonyms: NR111, PPP1R163
- Emplacement: Chromosome 12 : 47 841 537-47 943 048 brin inverse, GRCh38:CM000674.2
- À propos de ce gène: Ce gène possède 8 transcrits (variantes d'épissage), 461 orthologues , 18 par
- Transcriptions: Afficher le tableau de transcription
- Résumé:
 - Nom: VDR (symbole HGNC)
 - CRINIÈRE: Ce gène contient MANE Select ENST00000549336 , ENSP00000449573
 - UniProtKB: Ce gène possède des protéines qui correspondent aux identifiants UniProtKB si
 - RefSeq: Ce gène Ensembl/Gencode contient un ou plusieurs transcrits pour lesquels si d'autres transcrits RefSeq sont disponibles, ils figureront dans le tableau des.

Figure 2.13. Caractéristiques du gène *VDR*. La plateforme de la base de données montre les différentes caractéristiques du gène *VDR*, ensuite il faut cliquer sur « Séquence » pour afficher la séquence du gène (encadrer en rouge).

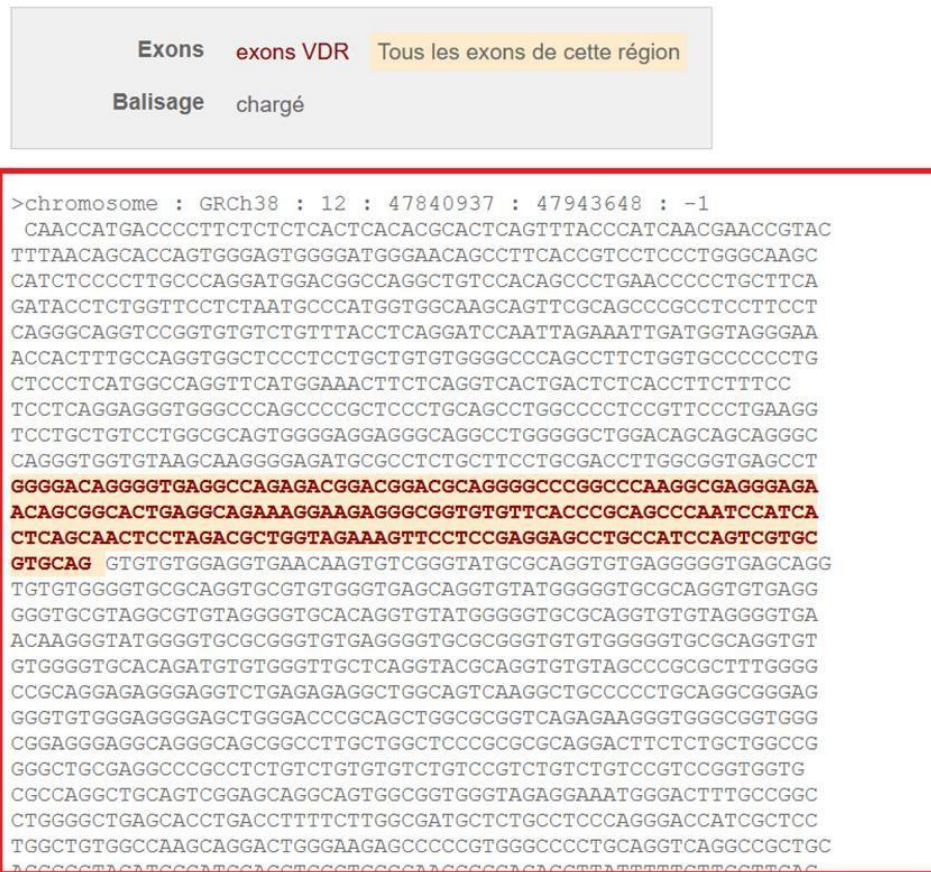


Figure 2.14. La séquence du gène *VDR* depuis la plateforme « Ensembl ». Les séquences codantes (Exons) sont représentées en rouge et les séquences non codantes (Introns) sont représentées en noir.

Il faut sélectionner une partie de la séquence et la copier sur un document Word (figure 2.16) Pour optimiser la recherche des amorces, il convient de choisir une séquence située en amont ainsi qu'une autre en aval de l'exon ciblé, afin de délimiter précisément la région d'intérêt.



Figure 2.15. La séquence d'intérêt (exon 3).

2.2.2.3. Outil Primer BLAST

Commencez par copier la séquence encadrant l'exon 3, puis collez-la dans la zone « FASTA ». Ensuite, éliminez les espaces ou interruptions non reconnues présents au sein de la séquence (figure 2.17).

Primer-BLAST Un outil pour trouver des amorces spécifiques

Trouver des amorces spécifiques à votre modèle PCR (à l'aide de Primer3 et BLAST).

Amorces pour cible sur un modèle | Amorces communes à un groupe de séquences

Récupérer les résultats récents | Conseils de publication | pour trouver des amorces : Enregistrer les paramètres

Modèle PCR

Saisissez la séquence d'accèsion, gi ou FASTA (un enregistrement refseq est préféré) ? Clair

Gamme ? Clair

De 1 à 250 A 410 à 660

Amorce directe 1 250

Apprêt inversé 410 660

Ou téléchargez le fichier FASTA Choisir un fichier Aucun fichier choisi

Figure 2.16. Analyse de la séquence d'intérêt par le Primer blast. On détermine les amorces sens et antisens (Forward et Reverse primer).

Ensuite, nous avons sélectionné certaines caractéristiques afin d'obtenir nos résultats (figure 2.18).

Vérification de la spécificité

Mode de recherche : Automatique ?

Base de données : Génomes d'organismes eucaryotes sélectionnés (assemblage primé) ?

Exclusion : ☐ Exclure les transcriptions Refseq prédites (accèsion avec préfixe XM, XR) ☐ Exclure les séquences d'échantillons non cultivés/ ?

Organisme : Homo sapiens Ajouter un organisme

Saisissez un nom d'organisme (ou un nom de groupe d'organismes tel que entérobactéries, rongeurs), un identifiant de taxonomie ou la liste de suggestions au fur et à mesure de votre saisie. ?

Requête Entrez (facultatif) ?

Stringence de la spécificité de l'amorce : L'apprêt doit avoir au moins 2 des inadéquations totales avec des cibles non prévues, y compris au moins 2 inadéquations au cours de la dernière 5 bps à l'extrémité 3'. ?

Ignorer les cibles qui ont 6 ou plusieurs incompatibilités avec l'amorce. ?

Taille maximale de l'amplicon cible : 4000 ?

Autoriser les variantes d'épissure : ☐ Permettre à l'amorce d'amplifier les variantes d'épissage de l'ARNm (nécessite une séquence d'ARNm refseq comme entrée du m

Obtenir des amorces Afficher les résultats dans une nouvelle fenêtre Utiliser la nouvelle vue graphique ?

Figure 2.17. Paramètres de vérification de la spécificité des paires d'amorces. Faire défiler la page en bas, puis (1) sélectionner la case où c'est écrit « RefSeq mRNA » et choisir « Genomes for selected organisms », ensuite (2) vérifier l'espèce que c'est bien « Homo sapiens », et après (4) cliquer sur « Get Primers » pour afficher les résultats.

2.2.3. PCR *in silico*

Les séquences des amorces sélectionnées ont été soumises à une analyse de validation par PCR *in silico* (PCR virtuelle), réalisée à l'aide de l'outil proposé par la plateforme UCSC Genome Browser (genome.ucsc.edu), afin de vérifier leur fiabilité (figure 2.19).

[Génomes](#) [Navigateur de génome](#) [Outils](#) [Miroirs](#) [Téléchargements](#) [Mes données](#) [Projets](#) [Aide](#) [À propos de nous](#)

PCR in silico UCSC

Génome: Humain

Assemblée: Déc. 2013 (GRCh38/hg38)

Cible: assemblage du génome

Amorce directe:

Apprêt inversé:

Soumettre

Taille maximale du produit:

Correspondance minimale parfaite:

Min bon match:

Retourner l'amorce inversée: ☐

Ajouter au résultat PCR existant: ☒

À propos de la PCR in silico

La PCR in silico V39x1 recherche une base de données de séquences avec une paire d'amorces PCR, en utilisant l'index BLAT pour une performance rapide. Visionnez exemple [vidéo](#) sur notre chaîne YouTube.

Cet outil ne garantit pas la détection de tous les emplacements hors cible ; il est optimisé pour les cibles à identité élevée. Pour la conception d'amorces, notamment dans régions répétitives, envisagez une validation supplémentaire avec des outils tels que [Primer Blast](#).

Si vous recherchez des correspondances avec des amorces de RT-PCR, où les amorces chevauchent souvent les limites intron-exon, modifiez l'option **Cible** et sélectionnez un ensemble de transcrits génétiques.

Options de configuration

Génome et assemblage - Base de données de séquences à rechercher.

Cible - Si disponible, choisissez d'interroger les séquences transcrites.

Amorce directe - Doit avoir une longueur d'au moins 15 bases.

Amorce inverse - Sur le brin opposé à l'amorce directe. Longueur minimale de 15 bases.

Chapitre 3. Résultats

3.1. Résultats du primer blast

La conception des amorces pour les gènes *CYP27B1* et *VDR* a été réalisée en plusieurs étapes. Dans un premier temps, le site Ensembl a été utilisé pour obtenir l'intégrité de ces gènes.

Le gène *CYP27B1* est composé de 9 exons. Dans cette étude, nous avons sélectionné l'exon 4, et le gène *VDR* compose 12 exons et nous avons choisir l'exon 3. Par la suite, le programme Primer-BLAST disponible sur la base de données NCBI a été utilisé, ce qui a permis de générer dix paires d'amorces pour les deux gènes

Le choix a été fait sur la paire 6 pour *CYP27B1* (figure 3.1), et les paire 6 et 8 pour *VDR* (figure 3.2,3.3), car elles répondent aux critères de bonnes amorces (tableau 3.1).

Primer pair 6

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TCCCGACTCTTAGCAGAGGG	Plus	20	98	117	60.40	60.00	4.00	3.00
Reverse primer	AGGATAAGGAGGTAGGCGGG	Minus	20	963	944	60.18	60.00	2.00	0.00
Product length	866								

Products on potentially unintended templates

>NC_000012.12 Homo sapiens chromosome 12, GRCh38.p14 Primary Assembly

product length = 866

Features associated with this product:

25-hydroxyvitamin d-1 alpha hydroxylase, mitochondrial

Forward primer	1	TCCCGACTCTTAGCAGAGGG	20
Template	57766670		57766651
Reverse primer	1	AGGATAAGGAGGTAGGCGGG	20
Template	57765805		57765824

>NC_000002.12 Homo sapiens chromosome 2, GRCh38.p14 Primary Assembly

product length = 3151

Features associated with this product:

phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 1 ...

phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 1 ...

Figure 3.1. La paire d'amorce choisie pour le gène *CYP27B1* par l'outil primer blast (paire 6)

Paire d'amorces 6

	Séquence (5'→3')	Modèle de brin	Longueur	Commencer	Arrêt Tm	GC%	Auto-complémentarité	Complémentarité 3' de soi
Amorce directe	TTCATGCCTCTCTGGCAGTC	Plus	20	6	25 59,75	55,00	5,00	1,00
Apprêt inversé	CTCTTCCTGCGACCTCTGTC	Moins	20	551	532 59,83	60,00	3,00	2,00
Longueur du produit 546								

Produits sur des modèles potentiellement non prévus

> NC_000012.12 Chromosome 12 d'Homo sapiens, GRCh38.p14 Assemblage primaire

longueur du produit = 546

Caractéristiques associées à ce produit :

isoforme vdrb1 du récepteur de la vitamine D3

isoforme x1 du récepteur de la vitamine D3

Amorce directe 1 TTCATGCCTCTCTGGCAGTC 20

Modèle 47900203 47900184

Amorce inverse 1 CTCTTCCTGCGACCTCTGTC 20

Modèle 47899658 47899677

longueur du produit = 3212

Caractéristiques associées à ce produit :

protéine centrosomale de l'isoforme b de 83 kda

Figure 3.2. Résultats du gène VDR (paire 6) par l'outil primer blast

Paire d'amorces 8

	Séquence (5'→3')	Modèle de brin	Longueur	Commencer	Arrêt Tm	GC%	Auto-complémentarité	Complémentarité 3' de soi
Amorce directe	CATGCCTCTCTGGCAGTCTT	Plus	20	8	27 59,75	55,00	5,00	1,00
Apprêt inversé	CAAGCCGTGTAAAGCAGTGG	Moins	20	486	467 59,76	55,00	3,00	1,00
Longueur du produit 479								

Produits sur des modèles potentiellement non prévus

> NC_000012.12 Chromosome 12 d'Homo sapiens, GRCh38.p14 Assemblage primaire

longueur du produit = 479

Caractéristiques associées à ce produit :

isoforme vdrb1 du récepteur de la vitamine D3

isoforme x1 du récepteur de la vitamine D3

Amorce directe 1 CATGCCTCTCTGGCAGTCTT 20

Modèle 47900201 47900182

Amorce inverse 1 CAAGCCGTGTAAAGCAGTGG 20

Modèle 47899723 47899742

> NC_000024.10 Chromosome Y d'Homo sapiens, GRCh38.p14 Assemblage primaire

longueur du produit = 3380

Caractéristiques associées à ce produit :

facteur de transcription de choc thermique, isoforme 2 liée à l'Y

Figure 3.3. Résultats du gène VDR paire 8 par l'outil primer blast

Tableau 3.2. La comparaison entre les critères d'une bonne amorce et notre amorce.

Les critères	Taux optimaux	Amorce du <i>CYP27B1</i> (paire 6)	Amorces du <i>VDR</i>	
			Paire 6	Paire 8
Longueur	18 à 30 nucléotides	20 nucléotides pour les deux amorces sens et anti-sens	20 nucléotides pour les deux amorces sens et anti-sens	
Température de fusion	55 C et 60 C	Amorces sens (60.40 C) Amorces anti-sens (60.18 C)	Amorces sens (59.75 C) Amorces anti-sens (59.83 C)	Amorces sens (59.75C) Amorces anti-sens (59.76C)
Teneur en CG	40 à 60%	Amorces sens (60%) Amorces anti-sens (60%)	Amorces sens (55%) Amorces anti-sens (60%)	Amorces sens (55%) Amorces anti-sens (55%)
Amorce spécifique	Inférieur à 1000 pb	866 pb	546 pb	479 pb
Produits aspécifiques	Supérieur à 1000 pb	Tous plus de 1000 pb	Tous plus de 1000 pb	

3.2 Confirmation des résultats

Pour confirmer les résultats, nous avons utilisé le programme *In-Silico* PCR disponible sur le site www.genome.ucsc.edu. Cet outil nous a permis de localiser le produit d'amplification sur le chromosome 12 pour les deux gènes *CYP27B1*(figure 3.4) et *VDR* (figure 3.5 et 3.6), confirmant ainsi la validité et la spécificité des amorces conçues.

Génomes
Navigateur de génome
Outils
Miroirs
Téléchargements
Mes données
Projets
Aide
À propos de nous

PCR in silico UCSC

> chr12:57765885-57766679 866pb TCCCGACTCTTAGCAGAGGG AGGATAAGGAGGTAGGCGGG

TCCCGACTCTTAGCAGAGGG gctgcgaagcgccttctcgtctcctga
ggtgtggagatccttcagataaagtacaagtcgcgggagggagggcg
gagtgaggcagtcctcgcctcgttcgagcttaagctacatgggtcc
ttttattcactgaggactcgtcctgagatggagagtcagacatggac
ttttagagatttctcctcgcagcagatgacagagagtcctgaatgtct
gccttgacaaagtctcggtttgcctatcacactcaacttctaggga
tgggaatgagagaggaggttgcagatcaaggcactacatagttg
ggcaccggagaaagcagagagtccttattcccaagccagtcacgctc
cttgccgtggcagagtcagagtcgaagtcctccgcccagtcacagtc
gtcctgtgtcgcctcccccaggtgagggcgccgacacttggggcg
gtgtggttagccagcttgggacagtcgcacgcgtgacgtggctgccc
tgcactctgcaggagctgctgcagagagggaccccgccgagcgtc
gcagcttctgcctggcagcagcgcgcgtgcgcgagcgggctgc
ggactgtcactgctgagtcctctcgtcccccagaagccagacgctc
gcagggccctctcgtcgtgggtccgaactatcaatctggggcat
ggggggaggtcggctgtccactctacattgggcatcttggggttcca
tcccagctctgttccacactcaggtgagcccaactcactcccg
CCTACCTCTTATCT

Températures de fusion de l'amorce

Avant : 61,8 C tcccgaactcttagcagagg
Arrière : 61,7 C aggataaggaggtaggcggg
Les calculs de température sont effectués en supposant une concentration de sel de 50 mM et d'oligo de recuit de 50 nM. Le code pour calculer la température de fusion provient de [Primer3](#), la formule de Rychlik W, Spencer WJ et Rhoads RE NAR 1990, qui peut être activée dans Primer3 avec PRIMER_TM_FORMULA=0.

Figure 3.4. Confirmation des résultats par le logiciel *in Silico*-PCR pour *CYP27B1*(paire 6).

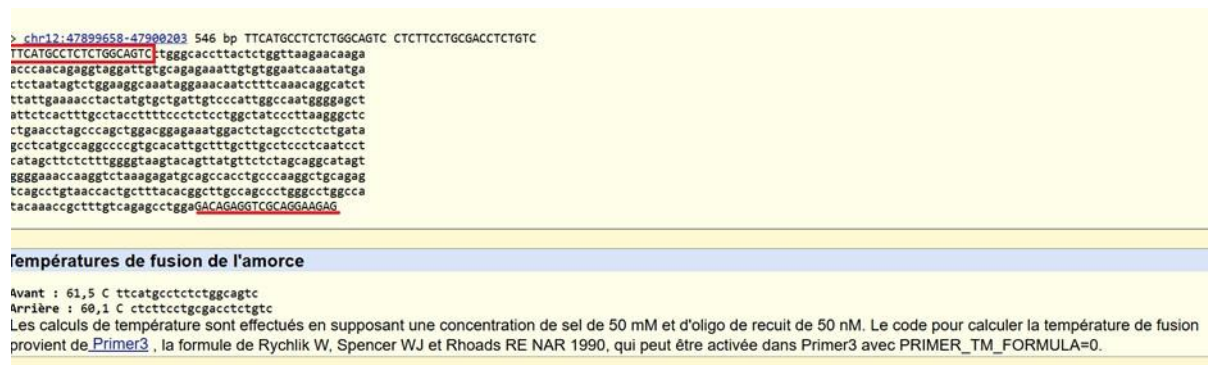


Figure3.5. Confirmation des résultats par le logiciel *in Silico*-PCR pour VDR (paire 6).

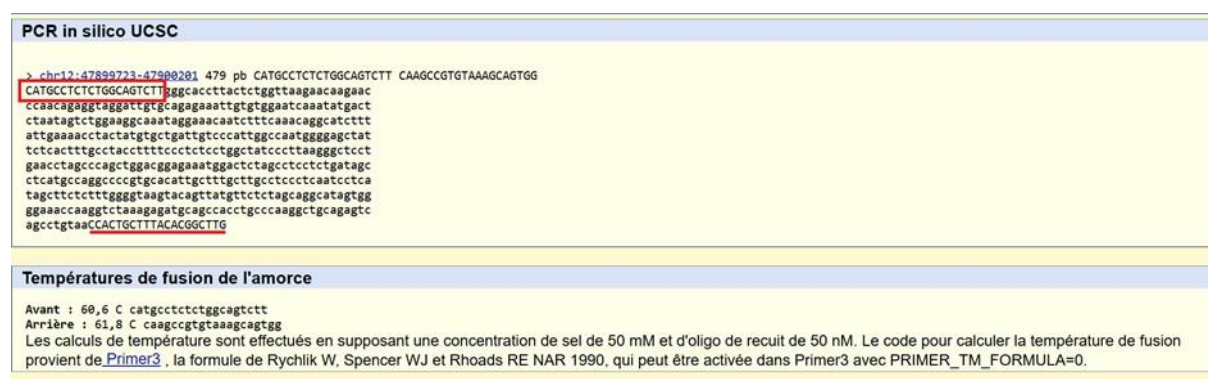


Figure3.6. Confirmation des résultats par le logiciel *in Silico*-PCR pour VDR (paire 8).

Chapitre 4. Conclusions et perspectives

La tuberculose est une maladie infectieuse grave qui demeure l'une des principales causes de mortalité dans le monde. Elle est provoquée par *M. tuberculosis*, une bactérie intracellulaire qui cible principalement les poumons.

Les macrophages jouent un rôle crucial dans la protection de l'organisme contre *cette bactérie*. En réponse à l'infection, ils expriment divers gènes impliqués dans la régulation de la réponse immunitaire. Parmi ces gènes, *CYP27B1*, responsable de l'activation de la vitamine D, et *VDR*, qui code pour son récepteur, occupent une place centrale dans le contrôle des mécanismes immunitaires.

L'étude de ces gènes nécessite l'utilisation de la technique PCR, qui permet d'amplifier des fragments d'ADN grâce à des amorces spécifiques. La conception précise de ces amorces constitue une étape cruciale pour assurer la fiabilité et le succès de l'expérience.

Ce travail avait pour objectif de concevoir des amorces spécifiques pour les gènes *CYP27B1* et *VDR*. Ces amorces permettront, dans des travaux futurs, d'analyser leur expression dans les macrophages lors de l'infection par *M. tuberculosis*, et d'évaluer le rôle de la vitamine D dans la modulation de la réponse immunitaire. Pour cela, des outils bio-informatiques tels que Primer-BLAST ont été utilisés pour concevoir des amorces ciblant respectivement l'exon 4 du gène *CYP27B1* et l'exon 3 du gène *VDR*. Les amorces retenues respectent l'ensemble des critères d'efficacité, et leur spécificité a été vérifiée par PCR *in silico*.

Les perspectives dans notre étude de conception incluent l'amélioration continue de la spécificité, de la sensibilité et de l'efficacité de nos amorces grâce à l'utilisation d'outils bio-informatiques avancés, ainsi que la validation rigoureuse en laboratoire. Ces avancées permettent d'élargir les applications de la PCR dans la recherche immunologique et le diagnostic médical.

Chapitre 5. Références bibliographiques

A

- Agarwal, K S. 2002. « The impact of atmospheric pollution on vitamin D status of infants and toddlers in Delhi, India ». *Archives of Disease in Childhood* 87 (2): 111-13. <https://doi.org/10.1136/ad.87.2.111>.
- Álvarez-Fernández, Rubén. 2013. « Explanatory Chapter ». In *Methods in Enzymology*, 529:1-21. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00001-X>.
- Andraos, Charlene, Gerrit Koorsen, Julian C. Knight, et Liza Bornman. 2011. « Vitamin D Receptor Gene Methylation Is Associated with Ethnicity, Tuberculosis, and TaqI Polymorphism ». *Human Immunology* 72 (3): 262-68. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2010.12.010>.
- Apte, Arun, et Saurabha Daniel. 2009. « PCR Primer Design ». *Cold Spring Harbor Protocols* 2009 (3): pdb.ip65. <https://doi.org/10.1101/pdb.ip65>.
- Atri, Chiraz, Fatma Z. Guerfali, et Dhafer Laouini. 2018. « Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (6): 1801. <https://doi.org/10.3390/ijms19061801>.

B

- Bartels, Lars Erik, Søren Peter Jørgensen, Jørgen Agnholt, Jens Kelsen, Christian Lodberg Hvas, et Jens Frederik Dahlerup. 2007. « 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and Dexamethasone Increase Interleukin-10 Production in CD4+ T Cells from Patients with Crohn's Disease ». *International Immunopharmacology* 7 (13): 1755-64. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2007.09.016>.
- Bashir, Samina, Yadhu Sharma, Asif Elahi, et Farah Khan. 2016. « Macrophage Polarization: The Link between Inflammation and Related Diseases ». *Inflammation Research* 65 (1): 1-11. <https://doi.org/10.1007/s00011-015-0874-1>.
- Birney, Ewan, T. Daniel Andrews, Paul Bevan, Mario Caccamo, Yuan Chen, Laura Clarke, Guy Coates, et al. 2004. « An Overview of Ensembl ». *Genome Research* 14 (5): 925-28. <https://doi.org/10.1101/gr.1860604>.
- Bussi, Claudio, et Maximiliano G Gutierrez. 2019. « *Mycobacterium Tuberculosis* Infection of Host Cells in Space and Time ». *FEMS Microbiology Reviews* 43 (4): 341-61. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz006>.

C

- Cambau, E., et M. Drancourt. 2014. « Steps towards the Discovery of *Mycobacterium Tuberculosis* by Robert Koch, 1882 ». *Clinical Microbiology and Infection* 20 (3): 196-201. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12555>.
- Charoenngam, Nipith, et Michael F. Holick. 2020. « Immunologic Effects of Vitamin D on Human Health and Disease ». *Nutrients* 12 (7): 2097. <https://doi.org/10.3390/nu12072097>.
- Christakos, Sylvia, Puneet Dhawan, Annemieke Verstuyf, Lieve Verlinden, et Geert Carmeliet. 2016. « Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects ». *Physiological Reviews* 96 (1): 365-408. <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2015>.
- Chuang, Li-Yeh, Yu-Huei Cheng, et Cheng-Hong Yang. 2013. « Specific Primer Design for the Polymerase Chain Reaction ». *Biotechnology Letters* 35 (10): 1541-49. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1249-8>.

Churchyard, Gavin, Peter Kim, N Sarita Shah, Roxana Rustomjee, Neel Gandhi, Barun Mathema, David Dowdy, Anne Kasmar, et Vicky Cardenas. 2017. « What We Know About Tuberculosis Transmission: An Overview ». *The Journal of Infectious Diseases* 216 (suppl_6): S629-35. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix362>.

Clifopoulos, Chris. 2017. « Vitamin D: An overview ». *Mediterranean Journal of Rheumatology* 28 (4): 206-9. <https://doi.org/10.31138/mjr.28.4.206>.

D

Daffé, Mamadou, et Hedia Marrakchi. 2019. « Unraveling the Structure of the Mycobacterial Envelope ». Édité par Vincent A. Fischetti, Richard P. Novick, Joseph J. Ferretti, Daniel A. Portnoy, Miriam Braunstein, et Julian I. Rood. *Microbiology Spectrum* 7 (4): 7.4.1. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0027-2018>.

Dattola, Annunziata, Martina Silvestri, Luigi Bennardo, Maria Passante, Elisabetta Scali, Cataldo Patruno, et Steven Paul Nisticò. 2020. « Role of Vitamins in Skin Health: A Systematic Review ». *Current Nutrition Reports* 9 (3): 226-35. <https://doi.org/10.1007/s13668-020-00322-4>.

Davies, Luke C, Stephen J Jenkins, Judith E Allen, et Philip R Taylor. 2013. « Tissue-Resident Macrophages ». *Nature Immunology* 14 (10): 986-95. <https://doi.org/10.1038/ni.2705>.

Delrue, Charlotte, et Marijn M. Speeckaert. 2023a. « Vitamin D and Vitamin D-Binding Protein in Health and Disease ». *International Journal of Molecular Sciences* 24 (5): 4642. <https://doi.org/10.3390/ijms24054642>.

———. 2023b. « Vitamin D and Vitamin D-Binding Protein in Health and Disease ». *International Journal of Molecular Sciences* 24 (5): 4642. <https://doi.org/10.3390/ijms24054642>.

Demir, Korcan, Walaa E. Kattan, Minjing Zou, Erdem Durmaz, Huda BinEssa, Özlem Nalbantoğlu, Roua A. Al-Rijjal, Brian Meyer, Behzat Özkan, et Yufei Shi. 2015. « Novel CYP27B1 Gene Mutations in Patients with Vitamin D-Dependent Rickets Type 1A ». Édité par Klaus Brusgaard. *PLOS ONE* 10 (7): e0131376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131376>.

Dobbs, Thomas E., et Risa M. Webb. 2017. « Chemotherapy of Tuberculosis ». Édité par David Schlossberg. *Microbiology Spectrum* 5 (2): 5.2.23. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TNMI7-0040-2017>.

Dominguez, Ligia J., Mario Farruggia, Nicola Veronese, et Mario Barbagallo. 2021. « Vitamin D Sources, Metabolism, and Deficiency: Available Compounds and Guidelines for Its Treatment ». *Metabolites* 11 (4): 255. <https://doi.org/10.3390/metabo11040255>.

Dyer, Sarah C, Olanrewaju Austine-Orimoloye, Andrey G Azov, Matthieu Barba, If Barnes, Vianey Paola Barrera-Enriquez, Arne Becker, et al. 2025. « Ensembl 2025 ». *Nucleic Acids Research* 53 (D1): D948-57. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1071>.

F

Fan, Xueli, Hongliang Zhang, Yun Cheng, Xinmei Jiang, Jie Zhu, et Tao Jin. 2016. « Double Roles of Macrophages in Human Neuroimmune Diseases and Their Animal Models ». *Mediators of Inflammation* 2016:1-13. <https://doi.org/10.1155/2016/8489251>.

- Fetahu, Irfete S., Julia HÃ¶baas, et EnikÅ‘ KÃ¶llay. 2014. « Vitamin D and the epigenome ». *Frontiers in Physiology* 5 (avril). <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00164>.
- Fogel, Nicole. 2015. « Tuberculosis: A Disease without Boundaries ». *Tuberculosis* 95 (5): 527-31. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.05.017>.

G

- Gagneux, Sebastien. 2018. « Ecology and Evolution of Mycobacterium Tuberculosis ». *Nature Reviews Microbiology* 16 (4): 202-13. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.8>.
- Garibyan, Lilit, et Nidhi Avashia. 2013. « Polymerase Chain Reaction ». *Journal of Investigative Dermatology* 133 (3): 1-4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>.
- Gensel, John C., et Bei Zhang. 2015. « Macrophage Activation and Its Role in Repair and Pathology after Spinal Cord Injury ». *Brain Research* 1619 (septembre):1-11. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.12.045>.
- Ghannam, Mousa G., et Matthew A. Varacallo. 2025. « Biochemistry, Polymerase Chain Reaction ». In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535453/>.
- Gibbins, Sophie L., Stacey M. Thomas, Shaikh M. Atif, Alexandra L. McCubbrey, A. Nicole Desch, Thomas Danhorn, Sonia M. Leach, et al. 2017. « Three Unique Interstitial Macrophages in the Murine Lung at Steady State ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 57 (1): 66-76. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0361OC>.
- Gordon, Siamon. 2016. « Phagocytosis: An Immunobiologic Process ». *Immunity* 44 (3): 463-75. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.026>.
- Guilliams, Martin, Ism   De Kleer, Sandrine Henri, Sijranke Post, Leen Vanhoutte, Sofie De Prijck, Kim Deswarte, Bernard Malissen, Hamida Hammad, et Bart N. Lambrecht. 2013. « Alveolar Macrophages Develop from Fetal Monocytes That Differentiate into Long-Lived Cells in the First Week of Life via GM-CSF ». *Journal of Experimental Medicine* 210 (10): 1977-92. <https://doi.org/10.1084/jem.20131199>.

H

- Harrison, Stephanie R., Danyang Li, Louisa E. Jeffery, Karim Raza, et Martin Hewison. 2020. « Vitamin D, Autoimmune Disease and Rheumatoid Arthritis ». *Calcified Tissue International* 106 (1): 58-75. <https://doi.org/10.1007/s00223-019-00577-2>.
- Hegarty, Lizi M., Gareth-Rhys Jones, et Calum C. Bain. 2023. « Macrophages in Intestinal Homeostasis and Inflammatory Bowel Disease ». *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 20 (8): 538-53. <https://doi.org/10.1038/s41575-023-00769-0>.
- Hendrix, Ivanka, Paul Anderson, Brian May, et Howard Morris. 2004. « Regulation of Gene Expression by the CYP27B1 Promoter—Study of a Transgenic Mouse Model ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 89-90 (mai):139-42. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.03.093>.
- Hung, Jui-Hung, et Zhiping Weng. 2016. « Designing Polymerase Chain Reaction Primers Using Primer3Plus ». *Cold Spring Harbor Protocols* 2016 (9): pdb.prot093096. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot093096>.

J

- Jacobo-Delgado, Yolanda M., Adrian Rodríguez-Carlos, Carmen J. Serrano, et Bruno Rivas-Santiago. 2023. « Mycobacterium tuberculosis cell-wall and antimicrobial peptides: a mission impossible? » *Frontiers in Immunology* 14 (mai):1194923. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1194923>.
- Janoušek, Jiří, Veronika Pilařová, Kateřina Macáková, Anderson Nomura, Jéssica Veiga-Matos, Diana Dias Da Silva, Fernando Remião, et al. 2022. « Vitamin D: Sources, Physiological Role, Biokinetics, Deficiency, Therapeutic Use, Toxicity, and Overview of Analytical Methods for Detection of Vitamin D and Its Metabolites ». *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 59 (8): 517-54. <https://doi.org/10.1080/10408363.2022.2070595>.
- Jeffery, Louisa E., Fiona Burke, Manuela Mura, Yong Zheng, Omar S. Qureshi, Martin Hewison, Lucy S. K. Walker, David A. Lammas, Karim Raza, et David M. Sansom. 2009. « 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 Combine to Inhibit T Cell Production of Inflammatory Cytokines and Promote Development of Regulatory T Cells Expressing CTLA-4 and FoxP3 ». *The Journal of Immunology* 183 (9): 5458-67. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803217>.
- Jeon, Sang-Min, et Eun-Ae Shin. 2018a. « Exploring Vitamin D Metabolism and Function in Cancer ». *Experimental & Molecular Medicine* 50 (4): 1-14. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0038-9>.
- . 2018b. « Exploring Vitamin D Metabolism and Function in Cancer ». *Experimental & Molecular Medicine* 50 (4): 1-14. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0038-9>.
- Jones, Glenville. 2022. « 100 YEARS OF VITAMIN D: Historical aspects of vitamin D ». *Endocrine Connections* 11 (4): e210594. <https://doi.org/10.1530/EC-21-0594>.
- Joshi, Mohini, et J. D. Deshpande. 2011. « POLYMERASE CHAIN REACTION: METHODS, PRINCIPLES AND APPLICATION ». *International Journal of Biomedical Research* 2 (1): 81-97. <https://doi.org/10.7439/ijbr.v2i1.83>.

K

- Kadri, Karim. 2020. « Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications ». In *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*, édité par Madan L. Nagpal, Oana-Maria Boldura, Cornel Baltă, et Shymaa Enany. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86491>.
- Khatua, Sutapa, Abby M. Geltemeyer, et Anand Gourishankar. 2017. « Tuberculosis: Is the Landscape Changing? » *Pediatric Research* 81 (1-2): 265-70. <https://doi.org/10.1038/pr.2016.205>.
- Khehra, Nimrat, Inderbir S. Padda, et Cathi J. Swift. 2025. « Polymerase Chain Reaction (PCR) ». In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/>.
- Kheiri, Babikir, Ahmed Abdalla, Mohammed Osman, Sahar Ahmed, Mustafa Hassan, et Ghassan Bachuwa. 2018. « Vitamin D Deficiency and Risk of Cardiovascular Diseases: A Narrative Review ». *Clinical Hypertension* 24 (1): 9. <https://doi.org/10.1186/s40885-018-0094-4>.
- Kizildag, Sefa, Halil Ates, et Servet Kizildag. 2010. « Treatment of K562 Cells with 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Induces Distinct Alterations in the Expression of Apoptosis-Related Genes BCL2, BAX, BCLXL, and P21 ». *Annals of Hematology* 89 (1): 1-7. <https://doi.org/10.1007/s00277-009-0766-y>.

- Koch, Anastasia, et Valerie Mizrahi. 2018. « Mycobacterium Tuberculosis ». *Trends in Microbiology* 26 (6): 555-56. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.02.012>.
- Kurotaki, Daisuke, Haruka Sasaki, et Tomohiko Tamura. 2017. « Transcriptional Control of Monocyte and Macrophage Development ». *International Immunology* 29 (3): 97-107. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxx016>.

L

- Lafuente, Esther M., Florence Niedergang, et Carlos Rosales. 2020. « Editorial: Phagocytosis: Molecular Mechanisms and Physiological Implications ». *Frontiers in Immunology* 11 (septembre):586918. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.586918>.
- Lendeckel, Uwe, Simone Venz, et Carmen Wolke. 2022. « Macrophages: Shapes and Functions ». *ChemTexts* 8 (2): 12. <https://doi.org/10.1007/s40828-022-00163-4>.
- Liu, Philip T., Mirjam Schenk, Valencia P. Walker, Paul W. Dempsey, Melissa Kanchanapoomi, Matthew Wheelwright, Aria Vazirnia, et al. 2009. « Convergence of IL-1 β and VDR Activation Pathways in Human TLR2/1-Induced Antimicrobial Responses ». Édité par Derya Unutmaz. *PLoS ONE* 4 (6): e5810. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005810>.
- Locati, Massimo, Graziella Curtale, et Alberto Mantovani. 2020. « Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity ». *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 15 (1): 123-47. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012718>.
- Lorenz, Todd C. 2012. « Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies ». *Journal of Visualized Experiments*, n° 63 (mai), 3998. <https://doi.org/10.3791/3998>.

M

- Ma, Yingyu, Wei-Dong Yu, Alejandro A. Hidalgo, Wei Luo, Remi Delansorne, Candace S. Johnson, et Donald L. Trump. 2013. « Inecalcitol, an Analog of 1,25D₃, Displays Enhanced Antitumor Activity through the Induction of Apoptosis in a Squamous Cell Carcinoma Model System ». *Cell Cycle* 12 (5): 743-52. <https://doi.org/10.4161/cc.23846>.
- Mahajan, Kanupriya, Himanshu Verma, Shalki Choudhary, Baddipadige Raju, et Om Silakari. 2021. « Identification of Kinase Inhibitors That Rule out the CYP27B1-Mediated Activation of Vitamin D: An Integrated Machine Learning and Structure-Based Drug Designing Approach ». *Molecular Diversity* 25 (3): 1617-41. <https://doi.org/10.1007/s11030-021-10270-y>.
- Mangtani, Punam, Ibrahim Abubakar, Cono Ariti, Rebecca Beynon, Laura Pimpin, Paul E. M. Fine, Laura C. Rodrigues, et al. 2014. « Protection by BCG Vaccine Against Tuberculosis: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials ». *Clinical Infectious Diseases* 58 (4): 470-80. <https://doi.org/10.1093/cid/cit790>.
- Martinez, Leonardo, Olivia Cords, Qiao Liu, Carlos Acuna-Villaorduna, Maryline Bonnet, Greg J Fox, Anna Cristina C Carvalho, et al. 2022. « Infant BCG Vaccination and Risk of Pulmonary and Extrapulmonary Tuberculosis throughout the Life Course: A Systematic Review and Individual Participant Data Meta-Analysis ». *The Lancet Global Health* 10 (9): e1307-16. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(22\)00283-2](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(22)00283-2).
- Mashabela, Gabriel T., Timothy J. De Wet, et Digby F. Warner. 2019. « Mycobacterium Tuberculosis Metabolism ». Édité par Vincent A. Fischetti, Richard P. Novick,

- Joseph J. Ferretti, Daniel A. Portnoy, Miriam Braunstein, et Julian I. Rood. *Microbiology Spectrum* 7 (4): 7.4.18. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0067-2019>.
- McCaffrey, Erin F., Michele Donato, Leeat Keren, Zhenghao Chen, Alea Delmastro, Megan B. Fitzpatrick, Sanjana Gupta, et al. 2022. « The Immunoregulatory Landscape of Human Tuberculosis Granulomas ». *Nature Immunology* 23 (2): 318-29. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-01121-x>.
- Mishra, Archita, et Avadhesha Surolia. 2018. « *Mycobacterium Tuberculosis* : Surviving and Indulging in an Unwelcoming Host ». *IUBMB Life* 70 (9): 917-25. <https://doi.org/10.1002/iub.1882>.
- Mizwicki, Mathew T., et Anthony W. Norman. 2009. « The Vitamin D Sterol–Vitamin D Receptor Ensemble Model Offers Unique Insights into Both Genomic and Rapid-Response Signaling ». *Science Signaling* 2 (75). <https://doi.org/10.1126/scisignal.275re4>.
- Mohr, Sharif 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>.
- Moretti, Rita, Maria Elisa Morelli, et Paola Caruso. 2018. « Vitamin D in Neurological Diseases: A Rationale for a Pathogenic Impact ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (8): 2245. <https://doi.org/10.3390/ijms19082245>.
- Mosser, David M., et Justin P. Edwards. 2008. « Exploring the Full Spectrum of Macrophage Activation ». *Nature Reviews Immunology* 8 (12): 958-69. <https://doi.org/10.1038/nri2448>.
- Müllebnner, Andrea, Gabriel G. Dorighello, Andrey V. Kozlov, et J. Catharina Duvigneau. 2018. « Interaction between Mitochondrial Reactive Oxygen Species, Heme Oxygenase, and Nitric Oxide Synthase Stimulates Phagocytosis in Macrophages ». *Frontiers in Medicine* 4 (janvier):252. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00252>.

N

- Norman, Anthony W. 2012. « 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>.

P

- Penna, Giuseppe, et Luciano Adorini. 2000. « 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 Inhibits Differentiation, Maturation, Activation, and Survival of Dendritic Cells Leading to Impaired Alloreactive T Cell Activation ». *The Journal of Immunology* 164 (5): 2405-11. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.5.2405>.
- Pezzella, A. Thomas. 2019. « History of Pulmonary Tuberculosis ». *Thoracic Surgery Clinics* 29 (1): 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.thorsurg.2018.09.002>.
- Pierens, S.L., et D.R. Fraser. 2015. « The Origin and Metabolism of Vitamin D in Rainbow Trout ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 145 (janvier):58-64. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.10.005>.
- Pike, J. Wesley, Mark B. Meyer, Seong-Min Lee, Melda Onal, et Nancy A. Benkusky. 2017. « The Vitamin D Receptor: Contemporary Genomic Approaches Reveal New Basic and Translational Insights ». *Journal of Clinical Investigation* 127 (4): 1146-54. <https://doi.org/10.1172/JCI88887>.
- Powledge, Tabitha M. 2004. « The Polymerase Chain Reaction ». *Advances in Physiology Education* 28 (2): 44-50. <https://doi.org/10.1152/advan.00002.2004>.

R

- Ramasamy, Indra. 2020a. « Vitamin D Metabolism and Guidelines for Vitamin D Supplementation ». *Clinical Biochemist Reviews* 41 (3): 103-26. <https://doi.org/10.33176/aacb-20-00006>.
- . 2020b. « Vitamin D Metabolism and Guidelines for Vitamin D Supplementation ». *Clinical Biochemist Reviews* 41 (3): 103-26. <https://doi.org/10.33176/AACB-20-00006>.
- Rangwala, Sanjida H., Anatoliy Kuznetsov, Victor Ananiev, Andrea Asztalos, Evgeny Borodin, Vladislav Evgeniev, Victor Joukov, et al. 2021. « Accessing NCBI Data Using the NCBI Sequence Viewer and Genome Data Viewer (GDV) ». *Genome Research* 31 (1): 159-69. <https://doi.org/10.1101/gr.266932.120>.
- Rosales, Carlos, et Eileen Uribe-Querol. 2017. « Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity ». *BioMed Research International* 2017:1-18. <https://doi.org/10.1155/2017/9042851>.
- Russell, David G, Pere-Joan Cardona, Mi-Jeong Kim, Sophie Allain, et Frédéric Altare. 2009. « Foamy Macrophages and the Progression of the Human Tuberculosis Granuloma ». *Nature Immunology* 10 (9): 943-48. <https://doi.org/10.1038/ni.1781>.

S

- Saccone, Donovan, Furaha Asani, et Liza Bornman. 2015. « Regulation of the Vitamin D Receptor Gene by Environment, Genetics and Epigenetics ». *Gene* 561 (2): 171-80. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.02.024>.
- Santa, Kazuki. 2023. « Macrophages: Phagocytosis, Antigen Presentation, and Activation of Immunity ». In *Physiology*, édité par Seyyed Shamsadin Athari et Entezar Mehrabi Nasab. Vol. 19. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.110832>.
- Segal-Maurer, Sorana. 2017. « Tuberculosis in Enclosed Populations ». Édité par David Schlossberg. *Microbiology Spectrum* 5 (2): 5.2.18. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TNMI7-0041-2017>.
- Septiyanto, Abdullah Faqih, Yuni Fitri Cahyaningsih Cahyono, Riyanarto Sarno, Fadlilatul Taufany, Siti Halimah Larekeng, Kelly Rossa Sungkono, Karlina Syahrudin, Endang Gati Lestari, et Sholiq. 2022. « An Improved Method for Prioritizing Polymerase Chain Reaction (PCR) Primer Design in Sanger Sequencing ». In *2022 6th International Conference on Information Technology, Information Systems and Electrical Engineering (ICITISEE)*, 443-48. Yogyakarta, Indonesia: IEEE. <https://doi.org/10.1109/ICITISEE57756.2022.10057821>.
- Shapouri-Moghaddam, Abbas, Saeed Mohammadian, Hossein Vazini, Mahdi Taghadosi, Seyed-Alireza Esmaeili, Fatemeh Mardani, Bitia Seifi, Asadollah Mohammadi, Jalil T. Afshari, et Amirhossein Sahebkar. 2018. « Macrophage Plasticity, Polarization, and Function in Health and Disease ». *Journal of Cellular Physiology* 233 (9): 6425-40. <https://doi.org/10.1002/jcp.26429>.
- Shingadia, Delane. 2012. « The Diagnosis of Tuberculosis ». *Pediatric Infectious Disease Journal* 31 (3): 302-5. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e318249f26d>.
- Sia, Jonathan Kevin, et Jyothi Rengarajan. 2019. « Immunology of *Mycobacterium Tuberculosis* Infections ». Édité par Vincent A. Fischetti, Richard P. Novick, Joseph J. Ferretti, Daniel A. Portnoy, Miriam Braunstein, et Julian I. Rood.

- Microbiology Spectrum* 7 (4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0022-2018>.
- Silva, Isabela Cristina Januário, et Marise Lazaretti-Castro. 2022. « Vitamin D Metabolism and Extraskelatal Outcomes: An Update ». *Archives of Endocrinology and Metabolism* 66 (5): 748-55. <https://doi.org/10.20945/2359-3997000000565>.
- Singh, Parul, Nagender Rao Rameshwaram, Sudip Ghosh, et Sangita Mukhopadhyay. 2018. « Cell Envelope Lipids in the Pathophysiology of *Mycobacterium Tuberculosis* ». *Future Microbiology* 13 (6): 689-710. <https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0135>.
- Singh, Vinayak, et Kelly Chibale. 2021. « Strategies to Combat Multi-Drug Resistance in Tuberculosis ». *Accounts of Chemical Research* 54 (10): 2361-76. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.0c00878>.
- Souberbielle, Jean-Claude. 2014. « Actualités sur la vitamine D ». *OCL* 21 (3): D304. <https://doi.org/10.1051/ocl/2013059>.
- Suárez, Isabelle, Sarah Maria Fünfer, Stefan Kröger, Jessica Rademacher, Gerd Fätkenheuer, et Jan Rybníček. 2019. « The Diagnosis and Treatment of Tuberculosis ». *Deutsches Ärzteblatt international*, octobre. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2019.0729>.
- Subbian, Selvakumar, Liana Tsenova, Mi-Jeong Kim, Helen C. Wainwright, Annalie Visser, Nirmalya Bandyopadhyay, Joel S. Bader, et al. 2015. « Lesion-Specific Immune Response in Granulomas of Patients with Pulmonary Tuberculosis: A Pilot Study ». Édité par Ludovic Tailleux. *PLOS ONE* 10 (7): e0132249. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132249>.

T

- Terry, Rachael L., et Stephen D. Miller. 2014. « Molecular Control of Monocyte Development ». *Cellular Immunology* 291 (1-2): 16-21. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.02.008>.
- Trzebanski, Sébastien, et Steffen Jung. 2020. « Plasticity of Monocyte Development and Monocyte Fates ». *Immunology Letters* 227 (novembre):66-78. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2020.07.007>.

U

- Umar, Meenakshi, Konduru S. Sastry, et Aouatef I. Chouchane. 2018a. « 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>.
- . 2018b. « 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>.
- Uribe-Querol, Eileen, et Carlos Rosales. 2020. « Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process ». *Frontiers in Immunology* 11 (juin):1066. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01066>.

V

- Van Crevel, Reinout, Tom H. M. Ottenhoff, et Jos W. M. Van Der Meer. 2002. « Innate Immunity to *Mycobacterium Tuberculosis* ». *Clinical Microbiology Reviews* 15 (2): 294-309. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.294-309.2002>.
- Vasiliu, Anca, Leonardo Martinez, Rishi K. Gupta, Yohhei Hamada, Tara Ness, Alexander Kay, Maryline Bonnet, et al. 2024. « Tuberculosis Prevention: Current

Strategies and Future Directions ». *Clinical Microbiology and Infection* 30 (9): 1123-30. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2023.10.023>.

Verma, Nikita, et Swarnlata Saraf. 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>.

W

Wang, Cheng, Cheng Ma, Lihong Gong, Yuqin Guo, Ke Fu, Yafang Zhang, Honglin Zhou, et Yunxia Li. 2021. « Macrophage Polarization and Its Role in Liver Disease ». *Frontiers in Immunology* 12 (décembre):803037. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.803037>.

Wang, Le-xun, Sheng-xi Zhang, Hui-juan Wu, Xiang-lu Rong, et Jiao Guo. 2019. « M2b Macrophage Polarization and Its Roles in Diseases ». *Journal of Leukocyte Biology* 106 (2): 345-58. <https://doi.org/10.1002/JLB.3RU1018-378RR>.

Wang, Tian-Tian, Frederick P. Nestel, Véronique Bourdeau, Yoshihiko Nagai, Qiuyu Wang, Jie Liao, Luz Tavera-Mendoza, et al. 2004. « Cutting Edge: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Is a Direct Inducer of Antimicrobial Peptide Gene Expression ». *The Journal of Immunology* 173 (5): 2909-12. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.5.2909>.

Weiss, Günter, et Ulrich E. Schaible. 2015. « Macrophage Defense Mechanisms against Intracellular Bacteria ». *Immunological Reviews* 264 (1): 182-203. <https://doi.org/10.1111/imr.12266>.

Wittmeier, Patrick, et Susanne Hummel. 2022. « Agarose Gel Electrophoresis to Assess PCR Product Yield: Comparison with Spectrophotometry, Fluorometry and qPCR ». *BioTechniques* 72 (4): 155-58. <https://doi.org/10.2144/btn-2021-0094>.

Wolf, George. 2004. « The Discovery of Vitamin D: The Contribution of Adolf Windaus ». *The Journal of Nutrition* 134 (6): 1299-1302. <https://doi.org/10.1093/jn/134.6.1299>.

Wynn, Thomas A., et Kevin M. Vannella. 2016. « Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis ». *Immunity* 44 (3): 450-62. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.015>.

X

Xia, Tingting, Meng Zhang, Wei Lei, Ruilin Yang, Shengping Fu, Zhenhai Fan, Ying Yang, et Tao Zhang. 2023. « Advances in the role of STAT3 in macrophage polarization ». *Frontiers in Immunology* 14 (avril):1160719. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1160719>.

Y

Yang, Zhu, Bei Shen, Lihuan Yue, Yuqing Miao, Yihong Hu, et Ruizhuo Ouyang. 2022. « Application of Nanomaterials to Enhance Polymerase Chain Reaction ». *Molecules* 27 (24): 8854. <https://doi.org/10.3390/molecules27248854>.

Ye, Jian, George Coulouris, Irena Zaretskaya, Ioana Cutcutache, Steve Rozen, et Thomas L Madden. 2012. « Primer-BLAST: A Tool to Design Target-Specific Primers for Polymerase Chain Reaction ». *BMC Bioinformatics* 13 (1): 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>.

Z

Zalewski, Adam, Nina S. Ma, Balazs Legeza, Nora Renthal, Christa E. Flück, et Amit V. Pandey. 2016. « Vitamin D-Dependent Rickets Type 1 Caused by Mutations

- in CYP27B1 Affecting Protein Interactions With Adrenodoxin ». *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 101 (9): 3409-18. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-2124>.
- Zhang, Haobo, Mengda Liu, Weixing Fan, Shufang Sun, et Xiaoxu Fan. 2022. « The impact of Mycobacterium tuberculosis complex in the environment on one health approach ». *Frontiers in Public Health* 10 (septembre):994745. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.994745>.
- Zhang, Kun, Jing Guo, Wenlong Yan, et Lingfen Xu. 2023. « Macrophage Polarization in Inflammatory Bowel Disease ». *Cell Communication and Signaling* 21 (1): 367. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01386-9>.
- Zmijewski, Michal A. 2019. « Vitamin D and Human Health ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (1): 145. <https://doi.org/10.3390/ijms20010145>.

Résumé

Introduction : *Mycobacterium tuberculosis* (M. tuberculosis) est une bactérie à Gram positif, pathogène intracellulaire responsable de la tuberculose chez l'homme. Le macrophage est une cellule clé de système immunitaire qui permet de détruire ce pathogène. Cette destruction peut être favorisée par la vitamine D qui stimule l'expression des gènes CYP27B1 et VDR qui sont impliqués dans la production des peptides antimicrobiens.

Objectif : Conception d'amorces encadrant les gènes CYP27B1 et VDR exprimés par le macrophage afin d'étudier leur expression par le macrophage au cours de l'infection par M. tuberculosis.

Matériel et méthodes : Afin de concevoir des amorces spécifiques des gènes CYP27B1 et VDR, on a utilisé plusieurs outils : la base de données « www.ensembl.org », pour trouver de séquence spécifique des gènes étudiés et un outil de primer-BLAST fourni par le NCBI pour concevoir des amorces. Les résultats sont confirmés par une PCR in silico.

Résultats : L'utilisation de l'outil Primer-BLAST a permis d'obtenir une amorce spécifique au gène CYP27B1 (paire 6) à savoir : F primer TCCCGACTCTTAGCAGAGGG, R primer AGGATAAGGAGGTAGGCGGG avec un produit spécifique de 866 pb, Tm (F primer 60,40°C, R primer : 60,18°C), la teneur en GC est 60% pour l'amorce sens et anti-sens et une longueur de 20 nucléotides pour les deux amorces. Pour le gène VDR, on a trouvé deux paires, la paire 6, F primer TTCATGCCTCTCTGGCAGTC, R primer CTCTTCCTGCGACCTCTGTC avec un produit spécifique de 546 pb, Tm (F primer 59,75°C, R primer : 59,83°C), la teneur en GC est de 55% pour l'amorce sens et 60% pour l'amorce anti-sens et une longueur de 20 nucléotides pour les deux amorces, et la paire 8, F primer CATGCCTCTCTGGCAGTCTT, R primer CAAGCCGTGTAAAGCAGTGG avec un produit spécifique de 479 pb, Tm (F primer 59,75°C, R primer : 59,76°C), la teneur en GC est de 55% pour l'amorce sens et anti-sens et une longueur de 20 nucléotides pour les deux amorces.

Conclusion : Le choix d'une bonne paire d'amorces pour amplifier les gènes CYP27B1 et VDR par PCR constitue une étape primordiale dans la réussite de cette technique et dans l'étude du rôle de ces gènes dans l'immunité anti infectieuse.

Mots clés : M. tuberculosis, Macrophage, Vitamine D, CYP27B1, VDR, PCR

Abstract

Introduction: *Mycobacterium tuberculosis* (M. tuberculosis) is a Gram-positive, intracellular pathogen responsible for tuberculosis in humans. The macrophage is a key cell of the immune system that destroys this pathogen. This destruction may be favored by vitamin D, which stimulates the expression of the CYP27B1 and VDR genes, promoting the production of antimicrobial peptides.

Objective: Design of primers flanking the CYP27B1 and VDR genes expressed by macrophages to study their expression in anti-infective immunity.

Material and Methods: To design primers specific to the CYP27B1 and VDR genes, several tools were used: the Ensembl database (www.ensembl.org) to find the specific sequences of the studied genes, and the Primer-BLAST tool provided by NCBI to design the primers. The results were confirmed by in silico PCR.

Results: Using the Primer-BLAST tool, a specific primer pair for the CYP27B1 gene (pair 6) was obtained: F primer TCCCGACTCTTAGCAGAGGG and R primer AGGATAAGGAGGTAGGCGGG. This pair yields a specific product of 866 bp, with a Tm of 60.40°C for the F primer and 60.18°C for the R primer. The GC content is 60% for both the sense and antisense primers, and both have a length of 20 nucleotides. For the VDR gene, two pairs were identified. Pair 6 (F primer: TTCATGCCTCTCTGGCAGTC; R primer: CTCTTCCTGCGACCTCTGTC) yields a specific product of 546 bp, with a Tm of 59.75°C (F primer) and 59.83°C (R primer), a GC content of 55% for the sense primer and 60% for the antisense primer, and a length of 20 nucleotides for both. Pair 8 (F primer: CATGCCTCTCTGGCAGTCTT; R primer: CAAGCCGTGTAAAGCAGTGG) yields a specific product of 479 bp, with a Tm of 59.75°C (F primer) and 59.76°C (R primer), a GC content of 55% for both sense and antisense primers, and a length of 20 nucleotides for both.

Conclusion: The selection of a suitable primer pair to amplify the CYP27B1 and VDR genes by PCR is a critical step for the success of this technique and for studying the role of these genes in anti-infective immunity.

Keywords: M. tuberculosis, Macrophage, Vitamin D, CYP27B1, VDR, PCR

الملخص

المقدمة: المتفطرة السلية هي بكتيريا إجابت الجرام وممرض داخل خلوي مسئول ممرض السل لدى الإنسان. تساهم الخلية البعثة الكبرية أساسية في جزاء الماكروفاغ تعمل في تدمير هذا الممرض، وتم التوسط في هذا التفاعل بواسطة تامم الذي يحفز التعبير الجيني لـ CYP27B1 و VDR، مما يتيح إنتاج البيبتيدات المضادة للميكروبات.

الهدف: تصميم بادئات لدراس التعبير الجيني لـ CYP27B1 و VDR لتكملة تم التعبير. زما في الخلايا البعثة الكبرية، وذلك بهدف دراس تعبيرهما الجيني في إطار الماكروفاغ ضد العدوى.

المواد والطرق: تم أجل تصليح بادئات خاضع بالجينات CYP27B1 و VDR، قاعدة البيانات (www.ensembl.org) "Ensembl" لتعويض في التسلسل لتسهيل الجيني المحدد لتعويض المدروس، وأداة Primer-BLAST لتصميم البادئات التي ورها المراكز الوطنية لمعلومات الجينوم (NCBI) وقد تم تأكيد إنتاج بواسطة محاكاة حاسوب لتفليل البوليمراز المتسلسل (In silico PCR).

النتائج: إنتاج استلخدام أداة Primer-BLAST للحصول على بادئات خارجية لـ CYP27B1 (الزوج 6)، وهو كالتالي: البادئة الأمامية TCCCGACTCTTAGCAGAGGG (F)، والبادئة العكسيلية

AGGATAAGGAGGTAGGCGGG (R)، مع منتج محدد طوله 866 زوج قاعدة، ودرجة انصهار (Tm) تبلغ 60.40°C للبادئة الأمامية و 60.18°C للبادئة العكسيلية. كانت نسبة GC لكل من البادئات 60% وطول لكل من 20 زوجة وتلذليل بالسليل للـ VDR، تم العثور على زوج من البادئات؛ الزوج 6، البادئة الأمامية TTCATGCCTCTCTGGCAGTC، والبادئة العكسيلية

CTCTTCCTGCGACCTCTGTC، مع منتج طوله 546 زوج قاعدة، ودرجة انصهار 59.75°C للبادئة الأمامية و 59.83°C للبادئة العكسيلية. كانت نسبة GC للبادئة الأمامية 55% و 60% للبادئة العكسيلية، وطول كل بادئة 20 زوجة وتلذليل بالسليل للـ VDR، تم العثور على زوج من البادئات؛ الزوج 8، كام البادئة الأمامية CATGCCTCTCTGGCAGTCTT والبادئة العكسيلية CAAGCCGTGTAAAGCAGTGG، مع منتج طوله

479 زوج قاعدة، ودرجة انصهار 59.75°C للبادئة الأمامية و 59.76°C للبادئة العكسيلية، ونسبة GC لكل من البادئات 55% و 60% وطول 20 زوجة وتلذليل بالسليل.

الخلاصة: تعتبر اختيار زوج من البادئات لتكبير جيني CYP27B1 و VDR بواسطة تقنيات الـ PCR خطوة أساسية لدراسة دور هذه الجينات في الماكروفاغ المضادة للعدوى. **الكلمات المفتاحية:** العدوى السلية، الخلايا البعثة (الماكروفاغ)، تامم، CYP27B1، VDR، تفليل البوليمراز المتسلسل.