

THÈSE

N° d'ordre :3419

En vue de l'obtention du : **DOCTORAT**

Structure de recherche : Laboratoire de Biologie des Pathologies Humaines

Discipline : Biologie

Spécialité : Immunologie-Immunogénétique

Présentée et soutenue le **16/01/2021** par :

Mounia QRAFLI

**Etude des facteurs génétiques de la prédisposition à la
tuberculose : Gènes candidats *CYP7A1* et *NSMAF***

Jury

Abderrahim SADAK	PES, Faculté des Sciences, Université Mohammed V, Rabat	Président
Khalid SADKI	PH, Faculté des Sciences, Université Mohammed V, Rabat	Directeur de Thèse
Jamal Dine BOURKADI	PES, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V, Rabat	Rapporteur/Examineur
Hakima KABBAJ	PES, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V, Rabat	Examinatrice
Hicham BELLAOUI	PES, Faculté des Sciences, Université Mohammed V, Rabat	Rapporteur/Examineur
Brahim ADMOU	PES, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Cadi Ayyad, Marrakech	Rapporteur/Examineur
Mohamed EL MZIBRI	PhD, Centre National d'Energie, des Sciences et Techniques Nucléaires, Rabat	Invité

Année universitaire: 2020/2021

Avant propos

Cette thèse a été réalisée dans le cadre du projet de recherche IMMGEN (Etude immunologique et immunogénétique de la tuberculose dans la population marocaine), financé par l'Académie Hassan II des Sciences et Technologie. Ce projet avait pour objectif général de contribuer à améliorer les outils diagnostiques, et à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques ou vaccinales, à travers l'analyse des trois composantes de la tuberculose (TB) dans la population marocaine:

1. La génétique de l'hôte (Axe de recherche 1: Étude de la susceptibilité génétique à la TB).
2. La réponse immunitaire (Axe de recherche 2 : Étude immunologique)
3. La diversité phénotypique et génotypique du *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) (Axe de recherche 3 : Étude génétique *Mtb*)

Vingt cinq centres d'inclusion et de prélèvement répartis dans 7 provinces au Maroc (Fès, Marrakech, Oujda, Tanger, Rabat, Salé et Casablanca) ont participé à l'étude: 7 hôpitaux, 12 Centres de Diagnostic et de Traitement des Maladies Respiratoires (CDTMR), 6 Centres Régionaux de Transfusion Sanguine (CRTS).

Le projet IMMGEN a été géré par un « project manager » qui a accompagné les équipes dans la conduite de l'étude sur le terrain à travers la mise en place d'un système d'assurance qualité, la coordination et le suivi des sites de recrutements, ainsi que la gestion des données.

J'estime que ce fut pour moi une opportunité rare et un honneur d'avoir intégré ce grand projet de recherche qui a regroupé des experts nationaux et internationaux dans la TB.

Je tiens tout d'abord, à exprimer mes sincères remerciements à mon directeur de thèse le Pr **SADKI Khalid**, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et pour m'avoir accordé toute sa confiance. Je lui suis reconnaissante pour ses qualités scientifiques. J'ai appris à ses côtés la rigueur, le souci du détail et j'ai développé ma passion à la recherche. Toute mon estime est pour vous.

Je remercie le Pr **SADAK Abderrahim**, professeur de biologie à la Faculté des Sciences de Rabat, d'avoir accepté spontanément d'être président du jury. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Je tiens aussi à exprimer ma reconnaissance au Pr **BOURKADDI Jamal Eddine**, professeur de pneumo-ptisiologie à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat et médecin chef de l'hôpital Moulay Youssef de Rabat. Malgré ses nombreuses responsabilités, il a toujours veillé à

soutenir, de près ou de loin, le bon déroulement de l'échantillonnage au sein du service de physiologie. Merci d'avoir accepté spontanément de rapporter ce travail.

Je remercie le Pr **BELLAOUI Hicham**, professeur de biologie à la Faculté des Sciences Rabat, d'avoir accepté de rapporter ce travail. Je vous exprime ma sincère reconnaissance. Vos commentaires et remarques permettront sûrement d'améliorer ce travail.

Un grand merci va également au Pr **KABBAJ Hakima**, médecin biologiste et professeur de microbiologie à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat d'avoir acceptée de faire partie de ce jury de thèse. Je vous exprime ma profonde gratitude. Votre regard critique sur ce travail me permettra sans doute de l'améliorer.

Je souhaite aussi remercier vivement le Pr **ADMOU Brahim**, professeur d'immunologie à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Marrakech pour l'intérêt qu'il a porté en acceptant d'évaluer mes travaux de thèse. Je suis particulièrement honorée de votre présence dans ce jury.

Mes vives remerciements vont au Dr **EL MZIBRI Mohamed**, chef du département des sciences de la vie au Centre National de l'Energie, des Sciences et des Techniques Nucléaires (CNESTEN), pour m'avoir accueillie au sein de l'unité mixte de recherche nutrition et alimentation. Il était disponible à toute demande d'aide. Je vous exprime ici monsieur, ma plus haute considération.

J'adresse mes sincères remerciements au Pr **Christian G. MEYER**, professeur de médecine interne et tropicale, Institut de Médecine Tropicale, Université Eberhard-Karls Tübingen, Allemagne, d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de recherche. Votre lecture critique de mon manuscrit de thèse est un véritable privilège pour moi, cher professeur. Merci pour vos encouragements.

J'exprime mes remerciements les plus distingués à l'**Académie Hassan II des Sciences et Techniques** en la personne de son Secrétaire perpétuel, Mr Omar FASSI FIHRI, ainsi qu'à tous les membres du collège des Sciences et Techniques du vivant, pour avoir financé ce travail. Merci de m'avoir accordé l'honorable opportunité de faire partie d'un si grand projet scientifique.

Je voudrais remercier également le Pr **EL AOUAD Rajae**, coordinatrice du projet de recherche, pour son implication et son dévouement à la recherche. Merci pour votre confiance et pour les moyens que vous avez mis à la disposition de notre laboratoire.

Je n'oublierai pas d'exprimer ma reconnaissance à tout le **personnel de l'Institut National d'Hygiène (INH)** pour le soutien moral et l'aide scientifique et technique. Qu'ils trouvent ici le témoignage de toute mon estime et ma sincère sympathie.

Je souhaite remercier particulièrement tous les **membres du Laboratoire de Génomique Humaine (LGH)**, pour leur sympathie et leur implication. Merci à Houda LAMSYEH, Youssef AMAR et Imane ASSEKAJ.

Mes sincères remerciements à tous **mes collaborateurs scientifiques** : Dr Fatima Zohra LAARABI pour le Nanodrop, Mr Hassan IHAZMADE et Mme Fatima EL FALAKI pour l'automate 7500 Fast, Dr Khalid KARI pour la chromatographie de haute performance, Mr Youssef AMAR pour la RFLP et Dr Marouane MELLOUL pour le séquençage. Sans oublier le Dr Rachid ABOUKHALID et Mr Ahmed AFAILAL TRIBAK pour l'assistance dans l'analyse génomique.

Je souhaite aussi remercier tout le **personnel de l'unité mixte de recherche nutrition et alimentation-CNESTEN**, pour leur précieuse aide et leurs qualités scientifiques, et particulièrement Dr KARI Khalid et Dr EL HAMDOUCHI Asmaa.

La suite de mes remerciements s'adresse au Pr **SEFFAR Myriam**, mon chef de service pour ses qualités humaines et scientifiques, ainsi qu'à tous mes collègues de travail du **Laboratoire Central de Virologie** et particulièrement, Chaimaa TAYEBI, Laila AIT LAMOUEDEN et Fatiha TANANI. Merci pour vos encouragements et vos prières.

Un grand merci **aux amis proches**. Je pense à Ikrame MORJANE, Hoda LAMSYEH, Houda HABBAN. Vous êtes des perles rares.

Je remercie bien entendu toute ma famille qui m'a toujours soutenu et qui m'a permis de réussir dans mes études. Merci à **mon père**, tu es toujours mon modèle, tu m'as appris à aimer la biologie.

Merci à **ma mère** pour ton amour et ta bonne humeur. Vous êtes une source d'énergie pour moi.

Je souhaite remercier **mon mari**. Merci Aziz de m'avoir supporté pendant toutes ces périodes de stress. Merci pour ton soutien et ton assistance informatique. Merci pour tout le background que tu as partagé avec moi et qui a contribué à ma réussite.

Mes vifs remerciements vont également à tous **nos collaborateurs**, médecins, infirmiers et techniciens du laboratoires des CDTMR et CRTS pour leur aide, leurs efforts et leur grand professionnalisme.

Et enfin, je voudrais exprimer ma profonde reconnaissance à **tous les patients et contrôles** qui ont accepté en plein grès de participer à ces travaux de recherche. Un grand merci à vous tous sans votre participation, ce travail n'aurai jamais vu le jour.

Merci à tous,

Résumé

La tuberculose est une maladie multifactorielle causée par des interactions complexes entre le bacille, des facteurs spécifiques à l'hôte, tels que le patrimoine génétique, et des facteurs environnementaux, tels que les carences en micronutriments. Comprendre ces interactions est essentiel pour développer de nouvelles stratégies de traitement.

Ces travaux de thèse ont d'abord rapporté que le génotype AA de rs3808607 et le génotype CT de rs1050504 sont associés de manière significative à un risque accru de tuberculose pulmonaire (OR 1,94, IC 95% 1,03–3,65; $p = 0,02$; OR 1,95, IC 95% 1,16–3,27; $p = 0,01$ respectivement). Alors que le génotype TT de rs1050504 était associé à une protection contre la tuberculose pulmonaire (OR 0,23, IC 95% 0,08–0,63; $p = 0,002$).

En outre, l'analyse des haplotypes de ces deux polymorphismes a montré que lorsque les génotypes AA rs3808607 et CT rs1050504 étaient co-hérités, la vulnérabilité à la tuberculose était très importante (OR 13,5, IC 95% 1,72–105,9; $p = 0,0006$). Nos résultats suggèrent que les variations génétiques dans les gènes *NSMAF* et *CYP7A1* pourraient moduler le risque de développer la tuberculose pulmonaire dans la population marocaine.

D'autre part, nous avons aussi montré que les patients tuberculeux présentent de faibles concentrations de rétinol plasmatique par rapport aux témoins sains. Nos données ont également révélé une discrimination sexuelle dans la carence en vitamine A. Les concentrations du rétinol étaient plus basses chez les hommes tuberculeux par rapport à leurs homologues sains.

Mots-clés: tuberculose, Marocaine, *CYP7A1*, *NSMAF*, vitamine A.

Abstract

Tuberculosis is a multifactorial disease resulting from complex interactions between bacillus, host-specific factors like genetic background, and environmental factors such as micronutrients deficiency. Understanding these interactions is necessary to develop new therapeutic strategies.

Through this scientific work, we first showed that the AA genotype of rs3808607 and CT genotype of rs1050504 were significantly associated with an increased risk for developing pulmonary TB (OR 1,94, IC 95% 1,03–3,65; $p = 0,02$; OR 1,95, IC 95% 1,16–3,27; $p = 0,01$ respectively). While, the TT genotype of rs1050504 was associated with protection against pulmonary TB (OR 0,23, IC 95% 0,08–0,63; $p = 0,002$).

In addition, haplotype analysis of these two polymorphisms showed that when the AA rs3808607 genotype and CT rs1050504 genotype are coinherited, susceptibility to develop TB becomes very important (OR 13,5, IC 95% 1,72–105,9; $p = 0,0006$). Our findings suggest that genetic variations in the *NSMAF* and *CYP7A1* genes could modulate the risk of pulmonary TB development in the Moroccan population. On the other hand, we have shown that tuberculosis patients have lower levels of retinol in plasma compared to healthy controls. Our data also revealed sexual discrimination in vitamin A deficiency, where retinol concentrations were lower in men with tuberculosis compared to healthy ones.

Key words: tuberculosis, Moroccan, *CYP7A1*, *NSMAF*, vitamin A.

ملخص

السل مرض متعدد العوامل، ينجم عن بعض التفاعلات المعقدة بين العصبية، والعوامل الخاصة بالمصاب، مثل التراث الوراثي، والعوامل المحيطة، كنقص المغذيات الدقيقة (الفيتامينات و المعادن). يعتبر فهم هذه التفاعلات ضروريا اذا أردنا تطوير استراتيجيات علاجية جديدة.

من خلال هذا البحث العلمي بينا أن النمطين الوراثيين AA ل rs3808607 و CT ل rs1050504 يرتبطان بشكل كبير بزيادة خطر الإصابة بالسل الرئوي لدى ساكنة المغرب، في حين يرتبط النمط الوراثي TT ل rs1050504 بمقاومة السل الرئوي. كما أظهر تحليل النمط الفردي (الهابلوتيب) لهذين الشكلين التعدديين أنه عندما يتم في آن واحد توريث AA ل rs3808607 و CT ل rs1050504، فإن قابلية الإصابة بالسل تصبح أكثر أهمية.

نتائج هذا العمل تمكننا من إفتراض أن الاختلافات الوراثية في جينات *NSMAF* و *CYP7A1* يمكن أن تؤثر على قابلية الإصابة بالسل الرئوي لدى السكان المغاربة. من جهة أخرى أظهرنا أن مرضى السل لديهم مستويات منخفضة من الريتينول في البلازما مقارنةً بالأصحاء. وكشفت بياناتنا أيضاً عن التمييز الجنسي في نقص فيتامين (أ)، حيث كانت تركيزات الريتينول أقل لدى الذكور المصابين بالسل مقارنة بنظرائهم الأصحاء، وهو الشيء الذي لم تتم ملاحظته لدى الإناث.

الكلمات المفتاحية: السل، المغاربة، *CYP7A1*، *NSMAF*، فيتامين أ

Liste des figures

- Figure 1 | Histoire de la découverte et du développement du traitement de la TB
- Figure 2 | Incidence estimée de la tuberculose en 2017
- Figure 3 | Incidence estimée de la TB en 2018, distribuée selon les régions marocaines.
- Figure 4 | Le cycle infectieux de la tuberculose
- Figure 5 | Étapes de la maturation des phagosomes
- Figure 6 | Structure et constituants cellulaire du granulome tuberculeux
- Figure 7 | Paroi cellulaire de *Mycobacterium tuberculosis*
- Figure 8 | Inhibition de la fusion du phagosome et du lysosome par *Mtb*
- Figure 9 | Interactions de *Mtb* avec le phagosome de macrophages activés
- Figure 10 | Stratégie générale de la recherche des gènes de susceptibilité dans une maladie multifactorielle comme la tuberculose
- Figure 11 | Spectre de prédisposition génétique à la tuberculose en fonction de l'âge des patients
- Figure 12 | Schéma représentatif montrant la localisation du gène *NSMAF* dans le chromosome 8
- Figure 13 | Structure de la protéine FAN
- Figure 14 | Structure chimique de la sphingomyéline
- Figure 15 | Structure chimique de la céramide
- Figure 16 | Interaction de la protéine FAN avec le TNFR1 et son rôle dans la signalisation pro-apoptotique
- Figure 17 | Rôle de FAN dans les voies de signalisation impliquant le récepteur TNFR1
- Figure 18 | Structure du gène *CYP7A1*
- Figure 19 | Régulation transcriptionnelle, FXR dépendante du gène *CYP7A1*
- Figure 20 | Régulation de l'expression du gène *CYP7A1* par l'activation intestinale du FXR
- Figure 21 | Régulation de la transcription du *CYP7A1* par différentes voies de signalisation indépendante du FXR
- Figure 22 | Schéma décrivant le rôle des enzymes de remodelage de la chromatine dans la régulation transcriptionnelle de *CYP7A1*
- Figure 23 | Localisation membranaire de cytochromes P450 dans le réticulum endoplasmique
- Figure 24 | Structure de l'enzyme CYP7A1
- Figure 25 | Les voies de biosynthèse des acides biliaires
- Figure 26 | Exemple de génotypage du rs3808607 par séquençage confirmant les résultats du PCR-RFLP
- Figure 27 | Localisation du rs3808607 dans le promoteur du gène *CYP7A1* à la position génomique 58500365
- Figure 28 | Localisation de la mutation (NC_000008.11: g.58500624 C>T) dans le promoteur du gène *CYP7A1*
- Figure 29 | Localisation de la mutation (NC_000008.11: g. 58500260 G>A)
- Figure 30 | Résultat d'alignement d'une séquence du promoteur du gène *CYP7A1* par rapport à la séquence de référence
- Figure 31 | Résultat d'alignement d'une séquence du promoteur du gène *CYP7A1* par rapport à la séquence de référence
- Figure 32 | Scénario proposé pour illustrer les mécanismes éventuels assurant la résistance à la TB chez les hommes marocains porteurs des deux génotypes rs3808607CC et rs1050504TT
- Figure 33 | Procédure d'extraction d'ADN par QIAamp® DNA Blood Maxi
- Figure 34 | Principe de la discrimination allélique par TaqMan®

Liste des tableaux

Tableau 1. Associations des variants génétiques de certains gènes avec la TB

Tableau 2. Polymorphismes de gènes candidats associés à la prédisposition à TB chez la population marocaine

Tableau 3. Caractéristiques démographiques et cliniques de la population étudiée

Liste d'abréviations

AB: acides biliaires	LD: Linkage disequilibrium
AC: Acides choliques	LR: Radeaux lipidiques
ACDC: Acides chenodeoxycholiques	LRH -1: Liver receptor homolog 1
ahpC: Hydroperoxyde-réductase d'alkyle	LXA4 : Lipoxine A4
sous-unité C	MAF: Minor allele frequency
AR: Androgen receptor	ManLAM : Mannose-capped
ATG: Autophagy related genes	lipoarabinomannan
ATPase CtpV : Metal cation transporting P-	MctB : Mycobacterial copper transport
type ATPase CtpV	protein B
ATRA: all trans Retinoïc Acid	MDR: Souches multirésistantes
BARE: Bile acid-responsive element	miARN: microARN
Bak : Bcl-2 homologous antagonist/killer	MP: Macrophage
Bax : Bcl-2-associated X protein	MR: Récepteur au mannose
BEACH: Beige and cheidiak-Higashi	MSMD: Mendelian susceptibility to
BHT: Buthylhydroxytoluène	mycobacterial diseases
CAR: Constitutive androstane receptor	<i>Mtb</i> : <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
CFP-10: 10-kDa culture filtrate protein	MyD88: Myeloid differentiation primary
CLR: C-type lectine receptor	response protein 88
CRP: C-réactive protein	<i>NEMO</i> : NF-kB essential modulator
CXCL2: C-X-C motif chemokine 2	NK: Lymphocyte Natural killer
<i>CYBB</i> : Cytochrome b-245, beta polypeptide	NPC2: Niemann-Pick disease type C2
<i>CYP7A1</i> : Cytochrome P450 sous famille A	NO: Oxyde d'azotes
membre 1	NOD: Nucleotid-binding oligomerization
DD: Death domaine	domain proteins
DHS: Site d'hypersensibilité de DNase I	NSD: Neutral sphingomyelinase domain
EEA-1: Early endosome antigen -1	NRAMP1: Natural resistance-associated
EGFR: Epidermal growth factor receptor	protein 1
ESAT-6: 6kDaA early secreted antigen target	NSMs: Neural sphingomyelinases
FGF19: Fibroblast growth factor 19	<i>NSMAF</i> : Neutral sphingomyelinase activation
FGFR4: Fibroblast growth factor receptor 4	associated factor.
FTF: Alpha(1)-fetoprotein transcription factor	OR: Odds ratio
FoxO1: Forkhead transcription factor O1	PAMPs: Pathogen-associated molecular
FXR: Farnsoïd X receptor	patterns
GWAS: Genome Wide Association Study	PGC-1 α : Peroxisome proliferator activated
HGF: Hepatocyte growth factor	receptor γ coactivator-1 α
HNF4 α : Hepatocytenuclear factor 4 alpha	PGE2: Prostaglandine eicosanoïde 2
HSC: Cellules stellaires hépatiques	PDIM: Phthiocerol DIMycoceroserate
HDACs: Histones desacétylases	PH: Pleckstrin homology
IC: Intervalle de confiance	PI-3P: Phosphatidyl inositol 3-phosphate
IL: Interleukine	PIP2: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
INF- γ : Interféron γ	ou PtdIns(4,5) P2
IRAK1: Interleukin-1 receptor associated	PKC: Protéine Kinase C
KatG: catalase-peroxidase	

PknE : Sérine/thréonine protéine kinase
PknG: Protéine kinase G
PPA: Protéines de phase aigüe
PPAR α : Peroxisome proliferator-activated receptor α
PRRs: Pattern Recognition Receptors
PXR: Pregnane X receptor
Rab5A: Ras-related protein Rab-5A
RACK1: receptor for activated C Kinase 1
RBP: Retinol binding protein
RE: Réticulum endoplasmique
RFLP: Restriction fragment length polymorphism
ROS: Reactifs oxygen species
RPA: Réaction de phase aiguë
RAR: Retinoid acid receptor
RXR α : Retinoid X receptor alpha
SHP: Small heterodimer partner
SIN3A: Paired amphipathic helix protein Sin3a

SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms
SR: Récepteurs scavengers
Sting: Stimulator of IFN genes
SXR: Steroid and xenobiotic sensing nuclear receptor
TACO: Tryptophan–aspartate containing coat
TB: Tuberculose
TGFB-1: Transforming growth factor beta 1
TLR: Toll-like receptor
TNF- α : Tumor necrosis factor alpha
TNFR-1: Tumor necrosis factor- receptor 1
TNF-R2: Tumor necrosis factor- receptor 2
UTR: Région non traduite
VDR: Vitamin D receptor
VIH: Virus de l'immunodéficience humaine
XDR: Souches ultrarésistantes

Liste de publications

Articles

1. **Mounia Qrafli**, Youssef Amar, Jamaledine Bourkadi, Jouda Ben Amor, Ghali Iraki, Youssef Bakri, Saaïd Amzazi, Ouafae Lahlou, Fouad Seghrouchni, Rajae El Aouad, Khalid Sadki. The CYP7A1 gene rs3808607 variant is associated with susceptibility of tuberculosis in Moroccan population. Pan African Medical Journal. 2014; 18:1 doi:10.11604/pamj.2014.18.1.3397
2. **Mounia Qrafli**, Imane Asekkaj, Jamal Eddine Bourkadi, Rajae El Aouad, Khalid Sadki. New variant identified in major susceptibility locus to tuberculosis on chromosomal region 8q12-q13 in Moroccan population: a case control study. BMC Infect Dis. 2017; 17: 712 doi: 10.1186/s12879-017-2807-9.
3. **Mounia Qrafli**, Khalid El Kari, Hassan Aguenau, Jamal Eddine Bourkadi, Khalid Sadki and Mohammed El Mzibri. Low plasma vitamin A concentration is associated with tuberculosis in Moroccan population: a preliminary case control study. BMC Res Notes. 2017; 10:421 doi 10.1186/s13104-017-2737-z.
4. **Mounia Qrafli**, Mustapha Najimi, Rajae Elaouad, Khalid Sadki. Current immunogenetic predisposition to tuberculosis in the Moroccan population. Int J Immunogenet. 2017;1–19 doi: 10.1111/iji.12340 (Annexe 6).

Communications:

- The *CYP7A1* gene rs3808607 variant is associated with susceptibility of tuberculosis in Moroccan population. 7th International Congress of Pathophysiology. Du 4 au 7 septembre, 2014. Faculté des Sciences, Université Mohammed V, Rabat.
- One genetic variant of *CYP7A1* gene is associated with susceptibility of tuberculosis in Moroccan population. Sommet UNESCO-Merck. 19 et 20 octobre 2015. Genève, Suisse. 5^{ème} prix d'excellence en recherche dans les maladies infectieuses.
- New Finding from Genetic Association Study of Tuberculosis Disease. Keystone Symposia Conference. Du 22 au 27 janvier, 2015. Santa Fe Community Convention Center, Santa Fe, New Mexico, USA. .
- Identification of a new genetic variant in *NSMAF* gene associated with pulmonary tuberculosis in Moroccan population. 8^{èmes} Journées Scientifiques de la Société Marocaine d'Immunologie. 24 et 25 novembre 2017. Faculté des Sciences Ain Chock, Casablanca.

Table des matières

Introduction générale	1
I Revue bibliographique	3
I.1 Histoire de la tuberculose	3
I.2 Epidémiologie.....	5
I.2.1 Dans le monde	5
I.2.2 Au Maroc.....	5
I.2.3 Facteurs de risque	8
I.2.3.1 Facteurs sociaux de la tuberculose:.....	8
I.2.3.2 Facteurs de risque endogènes:.....	8
I.3 Physiopathologie de la tuberculose.....	8
I.3.1 La réponse immunitaire contre le Mtb	8
I.3.1.1 Reconnaissance des antigènes mycobactériens	10
I.3.1.2 Phagocytose : Maturation et acidification de phagosomes/fusion avec le lysosome .	11
I.3.1.3 Induction de la réponse immunitaire adaptative : Th1/Th17	13
I.3.1.4 Formation du granulome	14
I.3.1.5 Autophagie	15
I.3.1.6 Peptides antimicrobiens.....	17
I.3.1.7 Apoptose.....	18
I.3.1.8 Modulation de la disponibilité des nutriments	19
I.3.2 Contournement des mécanismes bactéricides du macrophage.....	20
I.3.2.1 Recrutement des macrophages permissifs.....	20
I.3.2.2 Inhibition de la maturité et de l'acidification des phagosomes	20
I.3.2.3 Blocage de la fusion phagosome-lysosome.....	20
I.3.2.4 Résistance à la toxicité des réactifs azotés et oxygénés (RAO).....	22
I.3.2.5 Inhibition de l'apoptose.....	22
I.3.2.6 Echappement du cytosol.....	24
I.3.2.7 D'autres stratégies d'échappement aux mécanismes bactéricides	24
I.4 Facteurs génétiques de susceptibilité à la tuberculose.....	26
I.5 Le gène <i>NSMAF</i> (Neutral sphingomyelinase activation associated factor).....	34
I.5.1 Structure de la protéine FAN.....	34
I.5.2 Rôle de la protéine FAN:.....	35
I.5.2.1 Rôle de la protéine FAN dans le déclenchement de la sphingomyélinase neutre et la signalisation apoptotique	35

I.5.2.2	Implication de la protéine FAN dans l'inflammation et dans les réponses immunitaires	38
I.5.2.3	D'autres rôles physiologiques de la protéine FAN	38
I.6	Le gène <i>CYP7A1</i> (Cytochrome P450 sous famille A membre 1)	39
I.6.1	Régulation transcriptionnelle du gène <i>CYP7A1</i>	39
I.6.2	Associations des polymorphismes de <i>CYP7A1</i> à plusieurs maladies.....	46
I.6.3	Structure et localisation de la protéine CYP7A1	46
I.6.4	Rôle physiologique de CYP7A1	48
I.7	Objectifs.....	51
II	Matériels et méthodes	52
II.1	Type d'étude	52
II.2	Population de l'étude.....	52
II.2.1	Echantillonnage et lieux de recrutement	52
II.2.2	Prélèvements.....	53
II.2.3	Critères d'inclusion	53
II.2.4	Critères d'exclusion.....	53
II.2.5	Caractéristiques cliniques et démographiques de la population d'étude.....	53
II.3	Méthodologie	54
II.3.1	Choix de gènes candidats	54
II.3.2	Choix des mutations ponctuelles (SNP).....	54
II.3.3	Extraction de l'ADN génomique.....	55
II.3.4	Dosage et contrôle de la qualité de l'ADN.....	55
II.3.5	Génotypage par PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism)	55
II.3.6	Génotypage par hydrolyse de sondes fluorescentes TaqMan® MGB.....	56
II.3.7	Séquençage de la région promotrice du gène <i>CYP7A1</i> contenant le rs3808607	57
II.3.7.1	Amplification par PCR end-point.....	57
II.3.7.2	Purification de produits PCR.....	57
II.3.7.3	Réaction de séquence	57
II.3.7.4	Purification de la réaction de séquence	58
II.3.8	Extraction du rétinol et quantification par HPLC.....	58
II.3.8.1	Dénaturation des protéines et extraction du rétinol.....	58
II.3.8.2	Quantification du rétinol par HPLC	59
II.4	Analyses statistiques	60
II.4.1	Analyse des facteurs de prédisposition génétique	60
II.4.1.1	L'équilibre Hardy-Weinberg.....	60
II.4.1.2	Analyse statistique des fréquences alléliques et génotypiques	60
II.4.1.3	Estimation des fréquences d'haplotypes	60

II.4.2 Analyses statistiques de la concentration du rétinol.....	60
III Résultats.....	62
III.1 Identification d'un polymorphisme localisé dans la région 3'UTR du gène <i>NSMAF</i> génétiquement associé à la tuberculose	62
III.2 Association génétique entre le gène <i>CYP7A1</i> et la tuberculose.....	72
III.3 Validation des résultats obtenus par la PCR-RFLP	81
III.4 Association de la tuberculose avec la faible concentration de la vitamine A	87
IV Discussion	95
V Conclusions et perspectives	108
Annexes	110
Bibliographie	147

Introduction générale

La tuberculose (TB) est une maladie infectieuse causée par *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). C'est une maladie aussi ancienne que l'humanité, qui connaît une résurgence inquiétante. La gravité de cette pandémie est exacerbée par la synergie dangereuse avec le VIH et l'émergence de souches multirésistantes et ultrarésistantes (MDR et XDR) (WHO, 2019).

Pourtant bien que près du un tiers de la population mondiale (environ 2 milliards) soit infectée, il est assez remarquable de noter que la grande majorité (environ 90 %) ne présentera jamais de symptômes cliniques et que seuls 10% développent la maladie (WHO, 2019).

Ces différences de sensibilité des individus à cette infection, résultent des interactions complexes entre des facteurs liés au bacille, comme la virulence de la souche de *Mtb*, des facteurs de milieu et des facteurs propres à l'hôte incluant l'âge, la présence de carences nutritionnelles et surtout les facteurs de susceptibilité génétique.

L'implication de facteurs génétiques dans le développement de la TB a été soulignée par plusieurs études épidémiologiques et génétiques. Particulièrement, l'étude de liaison génétique réalisée sur une population marocaine qui a identifié un locus majeur de prédisposition à la TB pulmonaire située dans la région chromosomique 8q12–13.

L'identification d'une région qualifiée par une haute susceptibilité à la TB pulmonaire dans la population marocaine est une donnée fort-intéressante. Plusieurs gènes localisés dans cette région pourraient être potentiellement impliqués dans la susceptibilité à la TB. Nous en avons sélectionné deux gènes candidats: *NSMAF* et *CYP7A1*.

Par ailleurs, il a été rapporté que l'expression du *CYP7A1* est modulée par plusieurs effecteurs endogènes ou exogènes, parmi eux on trouve la vitamine A (Jahn et al., 2016; Saeed et al., 2017; Schmidt et al., 2010). La vitamine A joue un rôle central dans les réponses immunitaires et est donc essentielle pour la défense de l'hôte contre les agents pathogènes comme le *Mtb* (Guo et al., 2015; Raverdeau and Mills, 2014). Hall et al. ont montré que l'acide rétinoïque (AR) induisait les réponses inflammatoires Th1 et Th17 (Hall et al., 2011). Plus récemment, il a été démontré que la signalisation de l'AR conférait la stabilité des cellules Th1 et limitait leur conversion en cellules Th17 (Brown et al., 2015). De plus, il a été rapporté que les actions synergiques de l'AR et de la vitamine D sont capables de réguler négativement la transcription du gène de la protéine d'enveloppe contenant du tryptophane-aspartate (TACO: tryptophan–aspartate containing coat) dans les macrophages humains qui empêche la fusion entre le phagosome et le lysosome (Anand and Kaul, 2003). En outre, lorsque les macrophages THP-1 sont exposés à un acide chénodésoxycholique (acide biliaire primaire) /AR, l'entrée et la survie intracellulaire du *Mtb* sont

considérablement réduites (Anand and Kaul, 2005). De plus, l'administration orale de l'AR diminue la charge bactérienne de *Mtb* chez les rats traités à la AR par rapport au contrôle (Yamada et al., 2007). Par ailleurs, plusieurs observations épidémiologiques rapportent des taux plasmatiques faibles de vitamine A chez les patients tuberculeux comparés aux témoins (Ginawi, 2013; Karyadi et al., 2000; Koyanagi et al., 2004; Pakasi et al., 2009; Ramachandran et al., 2004; van Lettow et al., 2004). La confirmation de cette association entre les faibles concentrations en vitamine A et le développement de la TB chez la population marocaine, est un argument pour proposer des recommandations d'une supplémentation en vitamine A qui pourrait accompagner le traitement anti-tuberculeux.

Par ces présents travaux de recherche nous avons visé atteindre les objectifs suivants:

Objectif principal:

Contribuer à l'étude et à la recherche des facteurs génétiques de prédisposition à la TB localisés dans la région 8q12-13.

Objectifs spécifiques:

1. Etudier l'association des variants génétiques des gènes *CYP7A1* et *NSMAF* avec le développement de la TB.
2. Analyser les haplotypes des mutations sélectionnées.
3. Valider les résultats obtenus par PCR-RFLP par la technique du séquençage.
4. Evaluer l'impact des faibles concentrations en vitamine A sur le risque de développer la TB.

I Revue bibliographique

I.1 Histoire de la tuberculose

La tuberculose (TB) humaine est une des maladies les plus anciennes de l'humanité. Des preuves archéologiques ont montré la présence de la bactérie dans des tissus humains prélevés sur des momies égyptiennes, datant de 5400 avant JC, en découvrant la présence de l'ADN tuberculeux (Crubézy et al., 1998). Il y a 460 avant JC, Hippocrate identifie la TB, appelée "phtisis" dans l'Antiquité, comme une maladie qui se manifeste par un amaigrissement, une toux, du sang dans le crachat et conduit progressivement à la mort (Daniel and Iversen, 2015).

A la fin du XVIII ème et au début du XIX ème siècle, l'épidémie atteint son apogée en Europe et en Amérique du Nord, où la surpopulation urbaine et la dégradation des conditions d'hygiène, favorisent la contagion et donc la propagation de la maladie. A cette époque, le seul remède qui existait, était le repos dans les sanatoriums (Locht, 2016). En 1818, le diagnostic de la TB a été révolutionné par l'invention du stéthoscope par le médecin français René Laennec.

Ce n'est qu'en 1865, que le médecin Jean-Antoine Villemin, démontra expérimentalement le caractère contagieux de la TB en infectant des lapins à partir des crachats de patients tuberculeux. Malheureusement, cette grande découverte tomba à l'oubli (Daniel, 2006, 2015; Villemin, 1868).

Il a fallu attendre 1882 pour découvrir le bacille tuberculeux par le médecin allemand Robert Koch (1843-1910) (Koch, 1882). Puis vient la découverte des rayons X par Van Röntgen en 1895. Cet examen devint rapidement un outil indispensable pour le diagnostic et le suivi des patients tuberculeux. En 1921, Albert Calmette et Camille Guérin présenta le vaccin BCG (Bacille Calmette Guérin) préparé à partir d'une souche atténuée de *Mycobacterium bovis* (Calmette et al., 1921). Ainsi, la première vaccination chez l'homme a été effectuée en 1921 avec cette souche atténuée, appelée bacille de Calmette et Guérin (BCG) (Weill-Hallé and Turpin, 1925). En 1944, l'ère de la thérapie médicamenteuse commença avec la streptomycine (Schatz et al., 1944). Cette découverte marqua un tournant important dans la thérapie antituberculeuse vu qu'elle a contribué à une forte diminution de l'incidence de la maladie au cours de la seconde moitié du XX ème siècle dans les pays industrialisés. Malheureusement, les résistances à cet antibiotique apparurent en quelques mois. Par la suite, d'autres antibiotiques ont vu le jour; dont l'acide para-amino salicylique (1948), l'isoniazide (1952), le pyrazinamide (1954), la kanamycine (1957), ethionamide (1960) et l'éthambutol (1961) et la rifampycine (1963) (Figure 1).

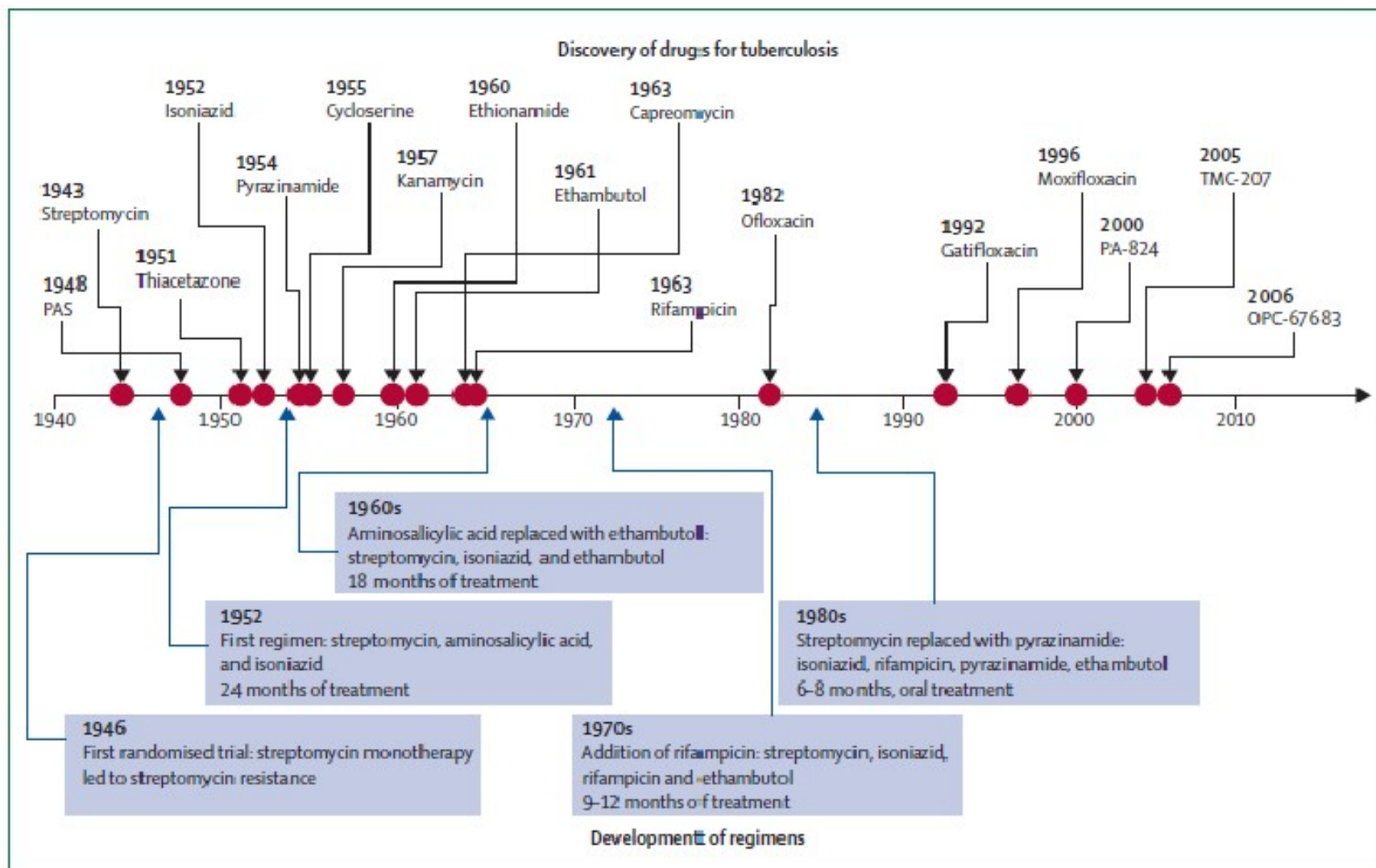


Figure 1 | Histoire de la découverte et du développement du traitement de la TB (Ma et al., 2010).

Par la suite, et grâce aux avancées technologiques en génomique, Cole et ses collaborateurs ont pu séquencé le génome de *Mtb*, qui est composé de 4,41 millions de bases dont 4000 gènes codants (Cole et al., 1998). Or, malgré tous ces progrès scientifiques, la TB n'a pas disparu ; des résurgences ont été déclarées partout dans le monde, en particulier dans les pays à faible revenu, mais aussi dans les pays développés notamment aux Etats-Unis et en Europe suite aux migrations Est-Ouest et suite à l'expansion de l'épidémie du VIH.

I.2 Epidémiologie

I.2.1 Dans le monde

La TB est une maladie infectieuse qui reste l'une des plus grandes menaces pour l'humanité. A l'échelle mondiale, on estime qu'il y a eu 10 millions de cas de TB en 2018, ce qui correspond à une moyenne globale de 130 cas pour 100 000 habitants (Figure 2). Les deux tiers des nouveaux cas enregistrés, venaient de huit pays : Inde (27 %), Chine (9 %), Indonésie (8 %), les Philippines (6 %), le Pakistan (6 %), le Nigéria (4 %), le Bangladesh (4 %) et l'Afrique du Sud (3 %) (WHO, 2019).

Globalement, le nombre de décès dus à la TB, chez les personnes VIH-négatives est estimé à 1,2 millions en 2018, auxquels s'ajoutent 251 000 décès chez les personnes VIH-positive.

L'OMS rapporte qu'en 2018, il y avait environ un demi-million de cas de TB multirésistante (MDR-TB) dont la moitié a été enregistrée en Inde (27 %), Chine (14 %) et la Fédération de Russie (9 %) (WHO, 2019).

I.2.2 Au Maroc

Malgré les efforts importants consentis par le ministère de la Santé dans les domaines de la prévention, du dépistage et de prise en charge des malades tuberculeux, la TB reste encore un problème majeur de santé publique au Maroc. En effet, la maladie touche surtout les adultes jeunes (d'âge compris entre 15 et 45 ans), qui représentent 64 % des cas. La distribution selon le sexe a révélé que 60 % des cas enregistrés étaient des hommes (DELM, 2018).

En 2018, le Maroc a notifié 30 977 cas incidents de la TB, toutes formes confondues, correspondant à une incidence notifiée de 87 cas pour 100 000 habitants (DELM, 2018). Le nombre estimé de décès liés à TB est de 2900 décès, correspondant à une mortalité spécifique de 8,1/100 000/an. Quant à la répartition de cas de TB par forme, la proportion de la forme de TB pulmonaire (TP) était la plus élevée en 2018, avec 52 % des cas, contre 48 % de cas d'extra-pulmonaire (TEP). En 2018, les données nationales concernant la TB pharmaco-résistante ont estimé à 288 le nombre de cas de TB multirésistante (MDR).

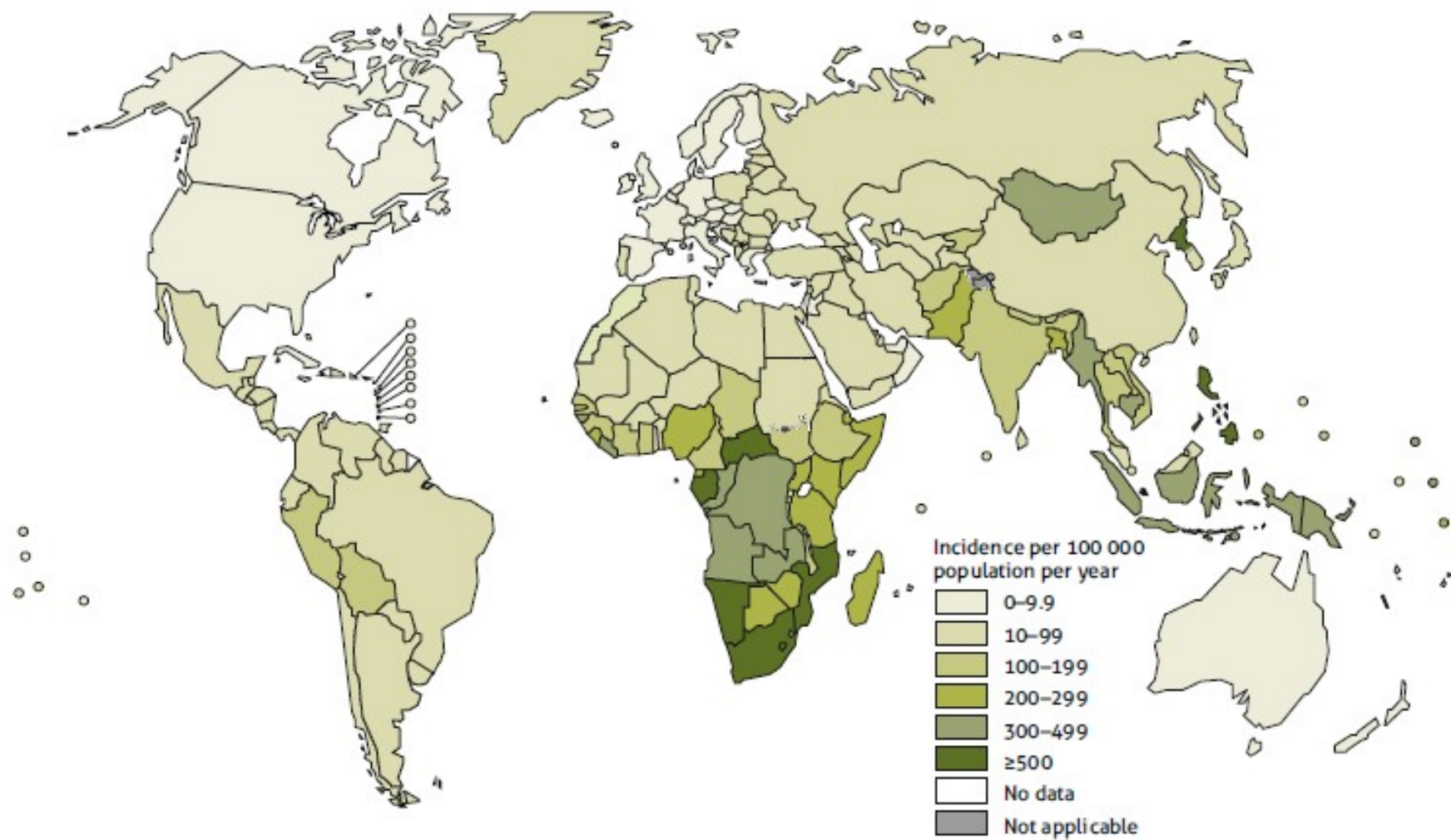


Figure 2 | Incidence estimée de la tuberculose en 2018 (WHO, 2019).

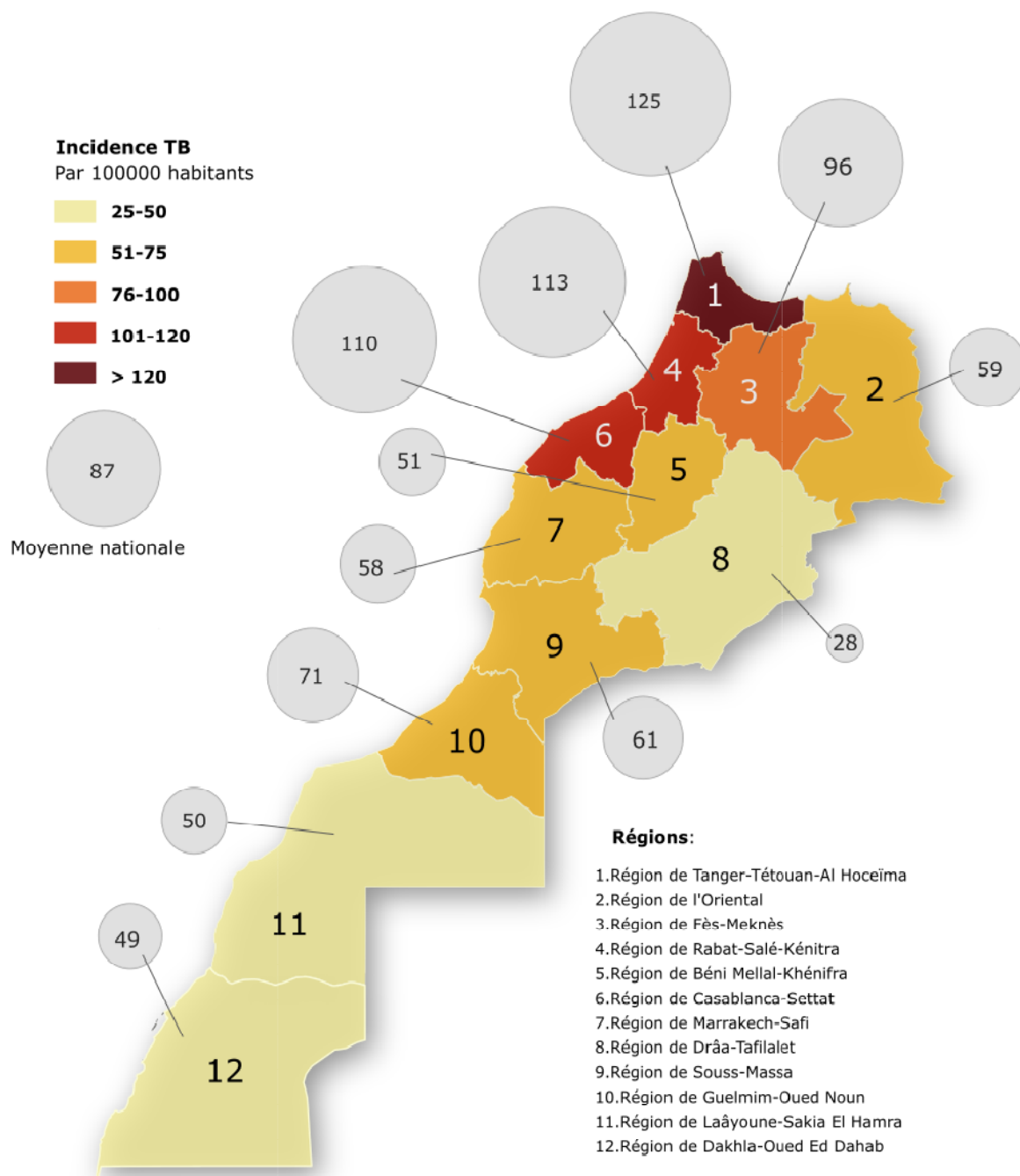


Figure 3 | Incidence estimée de la TB en 2018, distribuée selon les régions marocaines.

I.2.3 Facteurs de risque

Plusieurs facteurs ont été reliés au développement d'une infection tuberculeuse symptomatique qu'on peut les subdiviser en deux grandes catégories:

I.2.3.1 Facteurs sociaux de la tuberculose:

Les facteurs sociaux liés à la susceptibilité à la TB sont: la pauvreté, notamment les mauvaises conditions socio-économiques, le manque d'hygiène, la malnutrition et le mauvais accès aux soins médicaux, principalement dans les pays à faible revenu. D'autres facteurs sont incriminés comme la co-infection avec le VIH, l'incarcération, la toxicomanie, le tabagisme, l'alcoolisme, l'obésité et l'interférence avec des traitements utilisés contre d'autres pathologies comme les maladies chroniques inflammatoires (Duarte et al., 2018).

I.2.3.2 Facteurs de risque endogènes:

Au-delà des facteurs sociaux et environnementaux, le développement de la TB est lié à d'autres facteurs dits "endogènes". Dans ce contexte, il a été montré qu'il existe une différence de susceptibilité à la TB entre les hommes et les femmes (Neyrolles and Quintana-Murci, 2009), suggérant l'implication des hormones stéroïdes dans l'immunité anti-tuberculeuse.

Le diabète est aussi considéré un facteur de risque majeur pour développer une TB. En effet, l'incidence de TB chez les patients diabétiques est élevée (Lönnroth et al., 2010).

Outre le sexe et le diabète, l'influence génétique est démontrée largement comme un facteur agissant sur le devenir de la maladie. Des polymorphismes ont été identifiés (*HLA* classe II, *VDR*, *NRAMP1*...) (Fernández-Mestre et al., 2015; Hu et al., 2016; Li et al., 2011; Sveinbjornsson et al., 2016) et des régions chromosomiques ont été associées au risque de développer la TB (Baghdadi et al., 2006; Mahasirimongkol et al., 2012; Thye et al., 2010, 2012) que nous verrons plus en détails dans le paragraphe "Facteurs génétiques de prédisposition à la tuberculose".

I.3 Physiopathologie de la tuberculose

I.3.1 La réponse immunitaire contre le *Mtb*

La TB est une maladie très contagieuse qui se transmet par voie aérienne directe. La contagion est principalement interhumaine après la dispersion des gouttelettes de salive et de sécrétions bronchiques aéroportées générées quand une personne atteinte d'une TB pulmonaire parenchymateuse, laryngée tousse, éternue, parle, ou chante. Ces gouttelettes infectieuses peuvent rester en suspension pendant quelques minutes à quelques heures après expectoration (Lee et al., 2005) (figure 4).

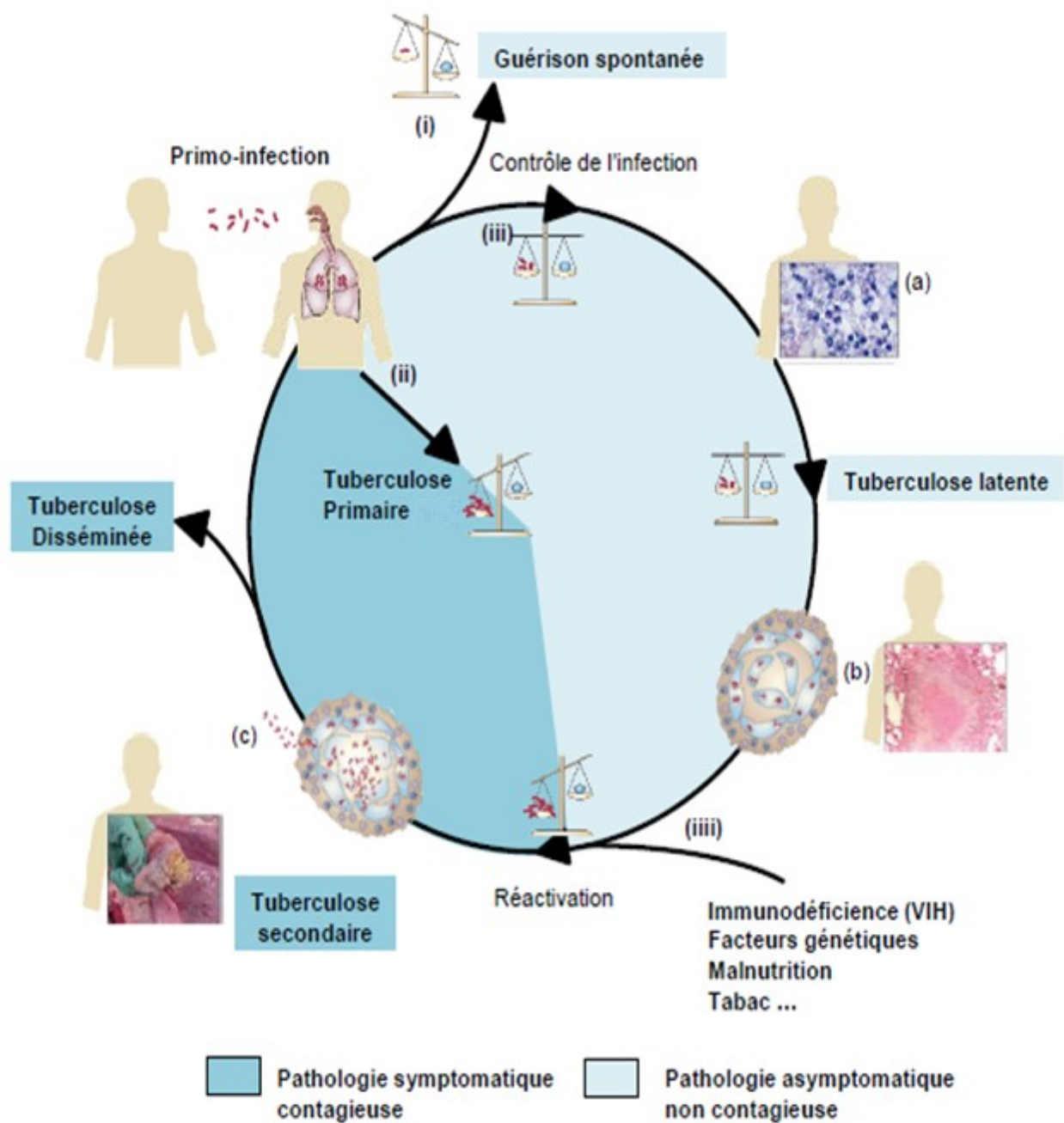


Figure 4 | Le cycle infectieux de la tuberculose

L'infection est initiée par l'inhalation de gouttelettes d'aérosol contenant des bactéries. **(i)** Le bacille peut être spontanément éliminé. **(ii)** L'infection peut induire le développement d'une tuberculose primaire parfois disséminée chez les individus immuno-déficients. **(iii)** Dans la majorité des cas, l'infection reste à l'état « latent », contrôlé par les acteurs de la réponse immunitaire (a) ce qui permet de contenir le bacille dans une structure appelée granulome (b). Cette phase est appelée tuberculose latente, elle est asymptomatique et non infectieuse. Cette forme latente peut progresser vers la tuberculose maladie on parle d'une réactivation **(iiii)** entraînant la dissémination du bacille dans l'ensemble de l'organisme suite à une dégradation progressive des granulomes (c). Il s'agit de la tuberculose secondaire. Les personnes atteintes sont contagieuses et peuvent propager l'infection (Kaufmann and McMichael, 2005).

I.3.1.1 Reconnaissance des antigènes mycobactériens

Une fois inhalés, les bacilles tuberculeux se heurtent à la première barrière de défense immunitaire, ils seront piégés dans le mucus qui existe dans les parties supérieures du système respiratoire et seront dirigés vers le haut et ainsi éliminés, on parle de "clairance immédiate de l'organisme". Si les bacilles échappent à cette barrière physique, ils contaminent l'espace alvéolaire. Ils seront reconnus et phagocytés par les macrophages alvéolaires après interaction entre les motifs antigéniques bactériens dits « PAMPs » (Pathogen-associated molecular patterns) par les différents récepteurs: les PRRs (Pattern Recognition Receptors). Cette reconnaissance est essentielle pour initier et coordonner la réponse immunitaire innée de l'hôte. Parmi ces récepteurs PRRs certains sont solubles, sécrétés dans le milieu extérieur, tels que les collectines et les pentraxines (Akira et al., 2006). Il existe également des récepteurs situés à la surface membranaires, tels que les lectines de type C (CLR pour « C-type lectine receptor »), les récepteurs de la partie constante des immunoglobulines (FcR), les récepteurs « scavengers » (SR) et surtout les récepteurs de la famille Toll: les TLRs (Toll like receptor). Enfin, on retrouve des PRRs intracellulaires, qui peuvent être des TLRs, des CLR ou des récepteurs de la famille NOD (Nucleotid-binding Oligomerization Domain proteins) (Jo, 2008).

Dans ce contexte, la reconnaissance par les TLRs est un événement précoce et crucial dans l'interaction entre le pathogène et la cellule hôte. Les signaux engendrés par l'engagement des TLRs avec les motifs antigéniques bactériens sont considérés comme l'arme la plus redoutable de l'immunité innée dans son combat contre l'infection à *Mtb* (Harding and Boom, 2010; Jo, 2008; Yang et al., 2007). Ils en résultent l'activation du facteur de transcription nucléaire NF- κ B menant à la production des cytokines pro-inflammatoires comme TNF- α (Tumor necrosis factor), l'interleukine-1 (IL-1), l'IL-12, des chemokines et des dérivés d'oxide d'azotes (NO) via les voies dépendante et indépendante MyD88 (myeloid differentiation primary response protein 88) (Jo, 2008; Jo et al., 2007; Xu et al., 2007; Yamamoto et al., 2003).

Par ailleurs, le système immunitaire dispose également de récepteurs cytoplasmiques spécialisés dans la reconnaissance de l'ADN, dits: STING (Stimulator of IFN genes) (Watson et al., 2015, 2012). Le rôle de cette protéine dans la réponse anti-*Mtb* a été décrit par les travaux de Watson et al qui ont montré que l'échappement de *Mtb* du phagosome expose l'ADN mycobactérien à STING (Watson et al., 2012).

Il est important de noter que l'interaction entre les nombreux motifs antigéniques de la paroi mycobactérienne complexe avec les différents PRRs, a plusieurs issues puisqu'elle peut avoir un effet activateur sur le macrophage associé à une réponse pro-inflammatoire ou au contraire un effet inhibiteur en faveur d'une entrée silencieuse du bacille c'est le cas par exemple du récepteur au

mannose (MR) qui mène à la phagocytose suite à la reconnaissance du ManLAM (mannose-capped lipoarabinomannan) présent dans l'enveloppe du *Mtb*, or cet engagement est associé à une réponse anti-inflammatoire, en faveur du bacille qui continue à se répliquer dans le macrophage (Chieppa et al., 2003; Schurz et al., 2015).

I.3.1.2 Phagocytose : Maturation et acidification de phagosomes/fusion avec le lysosome

La phagocytose du pathogène marque le début d'un long processus immunitaire de lutte contre le *Mtb*, durant lequel il y a production de plusieurs cytokines inflammatoires (exp: IL-12) et chimokines qui attirent au site de l'infection, les monocytes depuis les vaisseaux sanguins environnants qui vont se différencier en macrophages, les neutrophiles et les lymphocytes « natural killer » (NK). Ces derniers reconnaissent et éliminent les cellules infectées et activent les fonctions effectrices des macrophages (Russell, 2007).

Immédiatement après la capture du pathogène, le phagosome subit une série de transformations qui résultent d'interactions avec des intermédiaires de la voie d'endocytose (Rohde et al., 2007; Vieira et al., 2002). Cette maturation du phagosome se fait en différentes étapes depuis le phagosome précoce, passant par le phagosome intermédiaire jusqu'au phagosome tardif et enfin le phagolysosome (figure 5). Ce dernier est le compartiment qui contient de nombreuses enzymes et peptides antimicrobiens permettant la dégradation des bactéries. Cette maturation est marquée par l'acquisition précoce de Rab5A (Ras-related protein Rab-5A) qui grâce à l'augmentation du Ca^{2+} , recrute le complexe enzymatique EEA-1 (Early endosome antigen-1) et hVP34 kinase. Ceci permet le déclenchement d'une cascade signalétique qui aboutit à la phosphorylation du phosphatidyl inositol au phosphatidyl inositol 3-phosphate (PI-3P) dans la membrane phagosomale (Malik et al., 2001, 2000). Par la suite, le PI-3P va se lier à l'antigène-1 de l'endosome précoce (EEA-1), une liaison essentielle pour la formation du phagolysosome (Chua and Deretic, 2004; Clemens and Horwitz, 1995; Flannagan et al., 2009; Fratti et al., 2003; George et al., 2015; Kusner, 2005). Le PI-3P est un composé lipidique et est considéré comme un des facteurs essentiels de la maturation du phagosome et de la dégradation du contenu phagosomal. Au cours de la maturation, les phagosomes acquièrent diverses hydrolases et subissent une acidification progressive causée par le pompage de protons par la V-ATPase, permettant la translocation de protons de l'extérieur vers l'intérieur du phagosome. Ainsi, le pH de la lumière phagosomale devient très acide et peut atteindre 4,5 (figure 5) (George et al., 2015; Sturgill-Koszycki et al., 1994; Yates et al., 2005). Le phagosome acquiert tout au long de sa maturation des propriétés bactéricides.

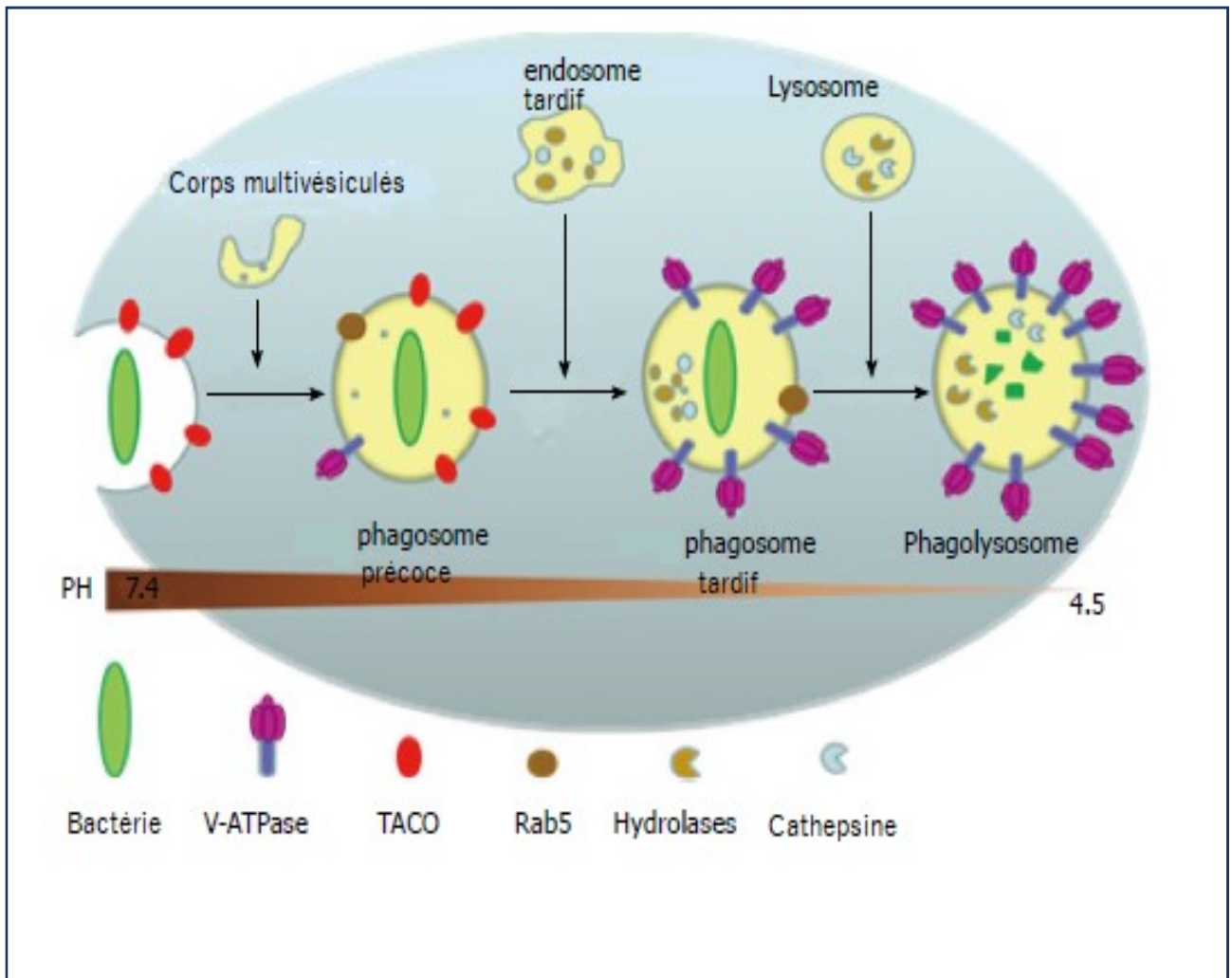


Figure 5 | Étapes de la maturation des phagosomes.

Immédiatement après la capture du pathogène, le phagosome subit une série de transformations. Ainsi le phagosome précoce se transforme en phagosome intermédiaire en interagissant avec l'endosome précoce et les corps multivésiculaires. Le phagosome intermédiaire fusionne avec l'endosome tardive et poursuit sa maturation pour atteindre le stade de phagosome tardif. Enfin, après fusion avec les lysosomes, le phagosome tardif aboutit à la formation du phagolysosome (George et al., 2015).

I.3.1.3 Induction de la réponse immunitaire adaptative : Th1/Th17

Lorsque les cellules dendritiques ont phagocyté un élément étranger. Elles migrent vers les ganglions lymphatiques locaux sous la dépendance de l'IL-8 pour présenter le peptide étranger aux lymphocytes T naïfs. La réponse adaptative déclenchée est très majoritairement de type Th1, avec une production importante d'interféron gamma (IFN γ) et d'IL-12. Les lymphocytes T s'activent et se différencient en cellules effectrices et migrent vers le site de l'infection et sont guidées par les chimiokines. Les antigènes mycobactériens présentés par les molécules CMH classe II situées au niveau des vacuoles, des phagosomes et des vésicules endocytiques, sont reconnus par les lymphocytes T CD4⁺. Ces cellules jouent un rôle primordiale dans la réponse spécifique contre le *Mtb*; En plus de la production précoce de l'INF- γ , les lymphocytes T CD4⁺ accomplissent d'autres fonctions secondaires critiques, comme l'implication dans l'apoptose des macrophages infectées via l'interaction Fas/ Fas ligand (voir la partie apoptose), la production d'autres cytokines, tels que l'IL-2 et le TNF- α , aussi l'induction d'autres cellules immunitaires (macrophages ou cellules dendritiques) pour produire d'autres cytokines immunorégulateurs comprenant l'IL-10, IL-12 et IL-15, et enfin l'activation d'autres macrophages via le contact direct avec le CD40 (Cella et al., 1996; Oddo et al., 1998; Caruso et al., 1999; Chan and Flynn, 2004; Cooper, 2009).

Il a été décrit que les lymphocytes T CD4⁺ sont critiques pour le déclenchement de la fonction cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ sous la dépendance de l'IL-15 (Cooper, 2009; Serbina et al., 2001). Il a été démontré aussi que les lymphocytes T CD4⁺ peuvent contrôler la croissance intracellulaire du *Mtb* par un mécanisme NO-dépendant à l'oxide d'azote (Cooper, 2009; Cowley and Elkins, 2003).

Quant aux lymphocytes T CD8⁺, ils reconnaissent les peptides antigéniques présentés par les molécules CMH classe I. Ils peuvent également produire l'IFN- γ à travers l'activation de leur TCR (T cell receptor) ou suite à leur interaction avec les cellules dendritiques infectées mais leur fonction principale est la mort de la cellule cible par lyse et la réduction du nombre de bactéries intracellulaires. Il a été rapporté que les lymphocytes TCD8⁺ qui expriment les perforines et les granzymes sont capables de tuer le *Mtb* directement et accèdent aux bactéries qui résident dans les macrophages à travers les pores formés par les perforines (Boom et al., 2003; Canaday et al., 2001). Les antigènes spécifiques des cellules T achèvent la mort des macrophages infectés principalement par le biais des mécanismes apoptotiques.

Les études de la TB sur le modèle animal ont montré que les lymphocytes T non conventionnelles telles que des cellules T à restriction CD1 et les cellules T- $\gamma\delta$ contribuent également à la protection contre la TB (Barral and Brenner, 2007; Beetz et al., 2008; Kaufmann, 2004). Les cellules T à restriction CD1 reconnaissent les glycolipides tels que le LAM, abondantes dans la paroi cellulaire

mycobactérienne, tandis que les cellules T- $\gamma\delta$ reconnaissent les petits métabolites contenant du phosphate (Phospholigands) (Kaufmann, 2004). En outre, les protéines CD1 ont la capacité de présenter des antigènes lipidiques et des lipopeptides aux lymphocytes T, et jouent donc un rôle important dans la réponse immunitaire contre le *Mtb* riche en lipides (Barral and Brenner, 2007; Moody et al., 2004; Winau et al., 2006).

Même si la réponse immunitaire adaptative liée à *Mtb* est de type Th1, plusieurs populations de lymphocytes différentes sont impliquées et participent également à la réponse immune protectrice. Ainsi, les lymphocytes Th17, producteurs d'IL-17 et d'IL-22, sont également induits par l'IL-23 produite par les cellules dendritiques dans les ganglions lymphatiques (Cooper, 2009). L'IL-17 est une cytokine pro-inflammatoire, qui une fois fixée sur son récepteur conduit à un recrutement de neutrophiles et une réponse inflammatoire, et une surproduction de cette cytokine peut induire des dommages tissulaires (Song and Qian, 2013; Zambrano-Zaragoza et al., 2014). Chez les patients atteints de la TB chronique, la production d'IL-17A est significativement plus faible que celle des contrôles sains (Segueni et al., 2016; Shen and Chen, 2018). IL-17A est impliqué dans la formation et la stabilité des granulomes en augmentant la production de chimiokines, qui aide à recruter des cellules inflammatoires migrant vers le site d'infection par *Mtb* (Okamoto Yoshida et al., 2010). Par ailleurs, l'IL-17F joue un rôle immunitaire protecteur similaire à l'IL-17A (Segueni et al., 2016).

I.3.1.4 Formation du granulome

Le recrutement successif de toutes ces différentes cellules immunitaires conduit à la formation d'une structure granulomateuse nodulaire nommée le granulome. C'est un microenvironnement capable de limiter la croissance des bacilles tuberculeux et établir la latence chez les patients à système immunitaire adéquat, on parle de "l'infection latente".

Si un épisode d'immunodéficience intervient au cours de la vie de l'individu, le granulome peut devenir caséux. Son intégrité n'est plus maintenue, la structure cellulaire peut-être rompue, libérant les macrophages nécrotiques ainsi que les bactéries qui reprennent une activité métabolique conduisant à la reprise de la réplication et de la multiplication et permettant alors de propager l'infection (Russell, 2007; Zhai et al., 2019). C'est la réactivation, dans ce cas l'infection n'est pas contrôlée et progresse vers "la tuberculose maladie" dite aussi "tuberculose active".

Le patient qui progresse vers la TB active devient contagieux et manifeste des symptômes souvent non spécifiques à savoir une fatigue, un malaise, une perte de poids et une fièvre modérée accompagnée des frissons et des sueurs nocturnes. Puis, un manque d'appétit s'installe. Finalement, une toux se développe chez la plupart des patients. Bien que la toux ne soit initialement pas productive, elle progresse vers une toux productive d'expectorations purulentes. L'expectoration

peut également être striée de sang, on parle d'hémoptysie. Le parenchyme enflammé peut provoquer une douleur thoracique pleurétique. Une maladie étendue peut entraîner une dyspnée ou une orthopnée, car l'augmentation du volume interstitiel entraîne une diminution de la capacité de diffusion pulmonaire (Knechel, 2009).

Le granulome tuberculeux est un agrégat compact et organisé de cellules (figure 6). Au centre, on trouve des macrophages, infectés et non infectés, entourés de cellules géantes de Langerhans et de macrophages spumeux, ou «foamy macrophages», qui sont caractérisées par l'accumulation de lipides (Ramakrishnan, 2012; Zhai et al., 2019). De nombreux autres types de cellules forment également le granulome, tels que les neutrophiles, les cellules dendritiques, les cellules NK, les fibroblastes, les lymphocytes B et T (majoritairement TCD4+). Les lymphocytes T CD4+ et les macrophages infectés sécrètent du TNF et de la lymphotoxine $\alpha 3$ qui permettent le recrutement de fibroblastes (Roach and Schorey, 2002; Zhai et al., 2019). Ces cellules assurent la formation d'une couche fibreuse périphérique composée de collagène et de composants de la matrice extracellulaire. Cette structure permet d'isoler la région infectée du reste des poumons et assure le maintien de l'intégralité du granulome.

Le centre du granulome devient un environnement hypoxique, privé de nutriments. *Mtb* entre alors dans un état de dormance avec une activité métabolique faible et un taux de croissance quasiment nul. L'infection est alors contenue, à ce stade le granulome est mature (Guirado and Schlesinger, 2013; Ramakrishnan, 2012; Zhai et al., 2019). Ce granulome mature peut évoluer vers une forme nécrotique qui se caractérise par le développement d'un centre caséeux. Le développement de ces structures nécrotiques favorise la dissémination des bacilles au reste de l'organisme.

I.3.1.5 Autophagie

L'autophagie est un processus cellulaire ubiquitaire important pour l'homéostasie cellulaire puisqu'il permet aux cellules la dégradation des composants cellulaires dysfonctionnels et inutiles, ce processus peut ou non entraîner la mort cellulaire (Lam et al., 2017). L'autophagie peut être induite en réponse à différents stimuli tels que le stress, la privation de nutriments et de facteur de croissance et la présence de cytokines proinflammatoires (comme l'INF- γ). Récemment, il a été rapporté que l'autophagie des macrophages infectés par *Mtb* est aussi induite par la vitamine A (acide rétinoïque all trans), qui permet de réduire la charge bactérienne (Coleman et al., 2018). A l'opposé, elle est inhibée lors d'une présence abondante de facteurs nutritifs, dans un environnement de type Th2 et par des hormones telles que l'insuline (Bhattacharya and Eissa, 2015; Kuballa et al., 2012; Virgin and Levine, 2009).

C'est un processus complexe faisant intervenir une trentaine de gènes dits ATG (autophagy related genes).

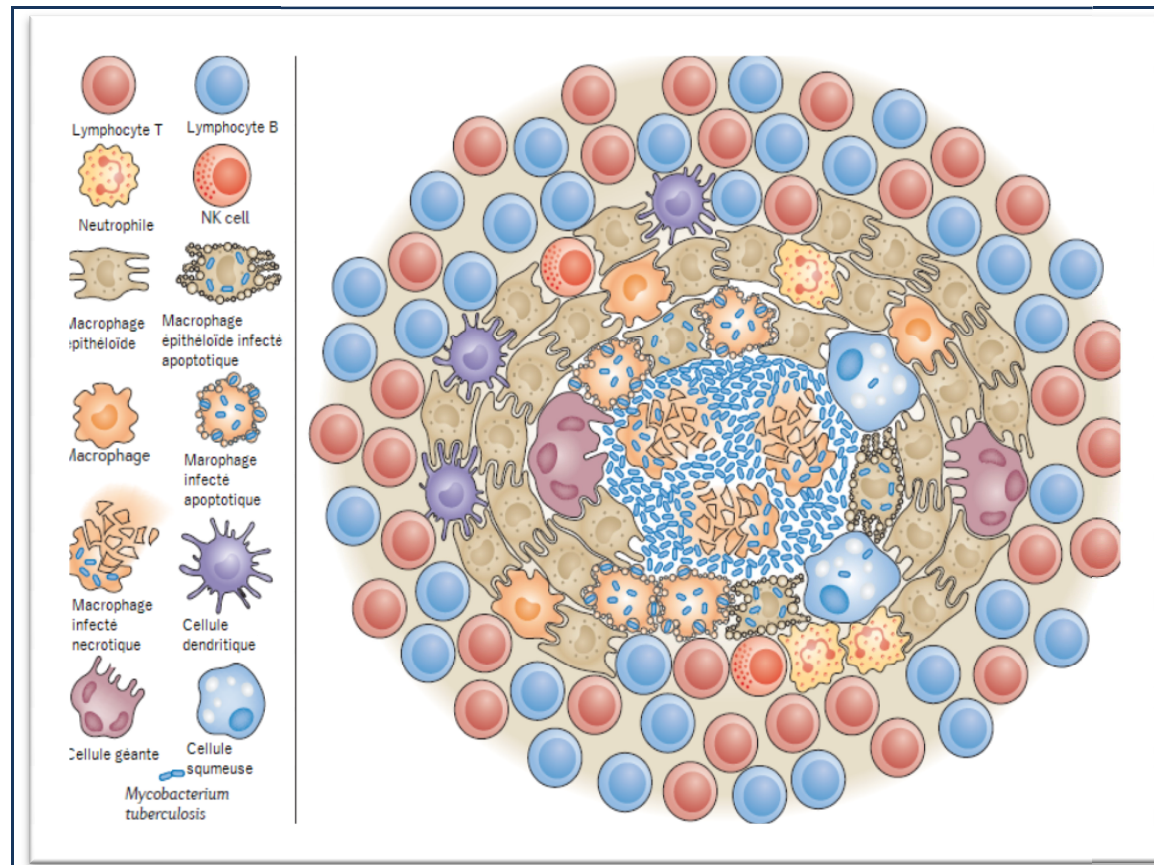


Figure 6 | Structure et constituants cellulaire du granulome tuberculeux

Le granulome tuberculeux est un agrégat compact et organisé de cellules épithélioïdes, de macrophages granulomateux peuvent également fusionner en cellules géantes multinucléées ou se différencier en cellules spumeuses, qui sont caractérisées par l'accumulation de lipides. De nombreux autres types de cellules forment également le granulome, tels que les neutrophiles, les cellules dendritiques, les lymphocytes B et T, les cellules NK, les fibroblastes. Les bactéries sont le plus souvent présentes dans les zones nécrotiques centrales (Ramakrishnan, 2012).

Pendant l'autophagie, les constituants cellulaires, tels que les protéines, les lipides et les organites, sont séquestrés en vésicules à double membrane appelées autophagosomes qui sont transportées vers des endosomes ou des lysosomes pour devenir des autophagolysosomes (Bhattacharya and Eissa, 2015). Au sein des autophagolysosomes, les enzymes hydrolases digèrent les composants autophages en leurs éléments de base (acides aminés et acides gras) pour être réutilisés pour la construction de cellules et la production d'énergie (Lam et al., 2017).

La xénophagie, processus par lequel l'autophagie élimine les bactéries par dégradation, a été signalée pour la première fois dans *Mtb* (Gutierrez et al., 2004). Il a été montré que la stimulation physiologique de l'autophagie dans les macrophages provoquait la maturation des phagosomes mycobactériens en phagolysosomes et conduisait à la suppression de la survie intracellulaire du *Mtb* (Gutierrez et al., 2004; Lam et al., 2017). En plus, la présence de *Mtb* dans le cytosol est fortement associée à l'activation de l'autophagie (Watson et al., 2012). Au cours de l'infection à *Mtb*, la production accrue d'IFN- γ active les macrophages pour induire l'autophagie et le trafic de *Mtb* vers les lysosomes en vue d'une dégradation (Dutta et al., 2012). L'induction de l'autophagie par l'IFN- γ est associée à une immunité protectrice contre la TB (Dutta et al., 2012; Lam et al., 2017).

En outre, des études ont montré le rôle de plusieurs facteurs d'autophagie, tels que ATG5, ATG12, ATG16L1, p62, la protéine de point nucléaire 52 (NDP52), la beclin 1 (BECN1) et LC3, dans la pathogenèse de l'infection à *Mtb* et d'autres infections, où la stimulation de l'autophagie augmente le taux de destruction des bactéries, tandis que la suppression de l'autophagie augmente la survie du *Mtb* (Gutierrez et al., 2004; Intemann et al., 2009; Dutta et al., 2012; Watson et al., 2012; Seto et al., 2013; J. Wang et al., 2013; Ye et al., 2014; Sakowski et al., 2015).

I.3.1.6 Peptides antimicrobiens

Les macrophages peuvent également détruire les microbes directement, sans nécessiter l'activation de la réponse adaptative, en utilisant les peptides antimicrobiens qui exercent leurs effets bactéricides. A cet égard, la vitamine D (25-hydroxyvitamin-D3) sous sa forme active (1,25 dihydroxyvitamin-D3), se lie à son récepteur (VDR : vitamin D receptor) et peut moduler l'expression de nombreux gènes (Brighenti et al., 2018; Liu et al., 2006). C'est un important régulateur de la réponse immunitaire anti-mycobactérienne, aidant les macrophages à atténuer la croissance de *Mtb* via un puissant peptide antimycobactérien nommée la cathelicidine D ou LL37 (Junaid and Rehman, 2019; Rockett et al., 1998). La production de la cathélicidine est indispensable à la formation des espèces réactives d'oxygène (ROS : Reactifs oxygen species) et la sécrétion de cytokines et chimiokines proinflammatoires par le macrophage (Yang et al., 2009).

Il existe d'autres peptides antimicrobiens exerçant l'effet bactéricide, notamment on retrouve de nombreuses défensines qui sont de petits peptides cationiques pouvant jouer un rôle bactéricide en

perméabilisant les membranes et en interagissant avec les constituants bactériens anioniques (Méndez-Samperio, 2008). Les défensines peuvent se lier à l'ADN et induire des cassures simple brin (Méndez-Samperio, 2008).

I.3.1.7 Apoptose

L'apoptose est une mort cellulaire programmée hautement régulée, associée à des modifications de l'organisation nucléaire et à la fragmentation de la chromatine. Durant ce processus, le cytoplasme et les autres composants cellulaires ne quittent jamais la cellule qui est en train de mourir, ce qui fait que l'apoptose est immunologiquement silencieuse (Lam et al., 2017; Srinivasan et al., 2014). Bien que l'apoptose lors d'infections microbiennes provoque des lésions tissulaires, son initiation peut être bénéfique pour l'hôte, car elle favorise l'élimination des microorganismes (Lam et al., 2017). Elle joue un rôle vital dans les défenses de l'hôte contre les agents pathogènes intracellulaires, y compris le *Mtb*, en empêchant la libération d'agents pathogènes intracellulaires et la propagation de l'infection par les mycobactéries. L'apoptose des macrophages peut limiter l'infection à mycobactéries en activant les réponses immunitaires innée et adaptative (Queval et al., 2017). Les corps apoptotiques contenant le cytoplasme cellulaire, d'autres organites cellulaires et les microorganismes sont phagocytés par les macrophages et les cellules dendritiques, puis subissent une dégradation et sont présentés aux autres cellules immunitaires (Behar et al., 2011; Schaible et al., 2003). Deux molécules clés régulent l'apoptose, la prostaglandine eicosanoïde 2 (PGE2) et la lipoxine A4 (LXA4) (Behar et al., 2011; Dennis, 1997).

Ce programme de mort cellulaire peut être activé par deux voies principales: extrinsèque et intrinsèque.

La voie extrinsèque est activée par la liaison d'un ligand à un récepteur de mort tel que le récepteur du TNF- α ou Fas (Behar et al., 2011; Lee et al., 2009). Il a été démontré que l'internalisation de *Mtb* par les macrophages est un puissant stimulant pour la production de TNF- α qui se lie à son récepteur TNFR1 (Lee et al., 2009; Srinivasan et al., 2014). Des domaines intracellulaires distincts du TNF-R1 ont été décrits comme le DD (death domaine) ou le NSD (neutral sphingomyelinase domain) (Micheau and Tschopp, 2003; Montfort et al., 2010; Schneider-Brachert et al., 2004). La transduction du signal TNF- α /TNFR1 induit plusieurs événements de signalisation intracellulaires complexes qui conduisent à l'activation de la caspase 8, qui activera ensuite les caspases 3, 6 et 7 (Hsu et al., 1996; Lee et al., 2006; Montfort et al., 2010; Behar et al., 2011; Srinivasan et al., 2014).

La voie de signalisation intrinsèque de l'apoptose peut être induite par une augmentation des espèces oxygénées réactives cytosoliques, exposition aux UV, un stress cellulaire (Behar et al., 2011; Lee et al., 2009). Ces événements modifieront l'équilibre des membres pro et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 en faveur de l'activation d'une majorité de protéines pro-

apoptotiques. Parmi elles on trouve, Bax (Bcl-2-associated X protein) et Bak (Bcl-2 homologous antagonist/killer), qui, après l'activation, forment des pores qui aboutissent à la perméabilité de la membrane mitochondriale et à la libération du cytochrome c dans le cytosol (Chipuk et al., 2012; Gao and Dou, 2000; Sheridan et al., 2008). Tout comme la caspase 8, la caspase 9 clive également et active les caspases 3, 6 et 7 (Behar et al., 2011; Hongmei, 2012). L'activation des caspases cible et active un large éventail de protéines cellulaires, responsables des modifications morphologiques associées à l'apoptose, telles que les DNases activées par la caspase qui clivent l'ADN chromosomique (Galluzzi et al., 2012; Lamkanfi and Dixit, 2010).

I.3.1.8 Modulation de la disponibilité des nutriments

Les macrophages possèdent un autre mécanisme bactéricide reposant sur la privation en nutriments. En effet, au cours de sa maturation après la phagocytose d'un corps étranger, le phagosome accumule à sa membrane la protéine NRAMP1 (natural resistance-associated protein 1) qui pompe, dans un mouvement d'antiport avec des protons, des ions fer et manganèse (Fe^{2+} , Mn^{2+}) depuis la lumière du phagosome vers le cytosol de la cellule, privant ainsi le micro-organisme de ces nutriments essentiels à sa survie et sa prolifération (Cellier et al., 2007; Forbes and Gros, 2001; Zhang et al., 2019). Par ailleurs, d'autres études suggèrent que le mécanisme inverse serait également vrai: les macrophages pourraient aussi non pas exclure mais accumuler des métaux, comme le cuivre ou le zinc, dans les phagosomes, à des concentrations potentiellement toxiques pour les micro-organismes (Neyrolles et al., 2013). Il a été montré que les souches mutantes *Mtb* déficientes en la protéine MctB (mycobacterial copper transport protein B) et l'ATPase CtpV (metal cation transporting P-type ATPase CtpV), nécessaires pour exclure le cuivre sont moins virulentes que la souche sauvage, ce qui montre qu'un système d'efflux de cuivre intact est nécessaire à la virulence de ces bactéries (Ward et al., 2010; Wolschendorf et al., 2011; Neyrolles et al., 2015). En outre, au cours de l'infection par *Mtb*, du zinc est libéré dans les macrophages, une fraction de ce zinc libre s'accumulant dans le phagosome mycobactérien (Botella et al., 2011).

Par ailleurs, les macrophages infectés par *Mtb* peuvent priver le bacille du cholestérol. A cet égard, des études ont montré que la phagocytose de *Mtb* et la persistance bactérienne au sein des macrophages dépendaient du cholestérol (Gatfield and Pieters, 2000; Nguyen and Pieters, 2005). En effet, *Mtb* peut accumuler et utiliser le cholestérol comme source de nutrition et exploiter les lipides dérivés de l'hôte pour réduire le stress métabolique, ce qui pourrait être un facteur déterminant de la virulence des pathogènes (Brzostek et al., 2009; Griffin et al., 2011, 2012; Koo et al., 2012; Lee et al., 2013). L'accumulation de lipides dans les lysosomes modifie le pH de la vésicule pour favoriser la survie des bactéries et inhibe la fusion entre phagosome-lysosome via le recrutement de la protéine TACO (Tryptophan-aspartate containing coat) (Vergne et al., 2005; Cox et al., 2007; Welin

et al., 2011). La régulation du cholestérol est une facette importante de l'interaction hôte-pathogène entre les cellules immunitaires et *Mtb*. Ainsi, il a été rapporté que les macrophages alvéolaires humains et murins et les cellules dendritiques peuvent produire l'acide rétinoïque all-trans (ATRA) (Coleman et al., 2013; Kim et al., 2019). Ce métabolite actif de la vitamine A (ATRA) induit une réduction du cholestérol cellulaire du macrophage avec coopération de la protéine transporteuse de lipides NPC2 (Niemann-Pick de type C2), entraînant une activité anti-*Mtb* (Wheelwright et al., 2014). Cette capacité de l'ATRA à limiter l'infection et à réduire la survie de *Mtb* dans les macrophages peut se réaliser aussi, en réprimant l'expression de la protéine TACO pour permettre la fusion phagosome-lysosome (Anand et al., 2008; Anand and Kaul, 2005).

I.3.2 Contournement des mécanismes bactéricides du macrophage

Mtb est un pathogène capable de détourner la réponse immunitaire de l'hôte au profit de sa survie, en employant plusieurs stratégies. La structure particulière de sa paroi est fortement responsable de la survie et de la réplication du bacille dans le macrophage (Figure 7).

I.3.2.1 Recrutement des macrophages permissifs

Tous d'abord, *Mtb* est capable d'éviter le recrutement de macrophages microbicides, producteurs de NO. Il a été montré qu'il utilise un lipide de sa paroi, appelé le phthiocerol DIMycoceroserate (PDIM), pour masquer ses PAMPs pour qu'il soit phagocyté par les macrophages permissifs et non par les macrophages microbicides, producteurs de NO (Cambier et al., 2014).

I.3.2.2 Inhibition de la maturité et de l'acidification des phagosomes

Le *Mtb* est capable de moduler la cascade signalétique- Ca^{2+} , il sécrète ainsi une phosphatase appelée : SapM, qui hydrolyse et inactive le PI-3P; et bloque l'entrée des hydrolases et le recrutement de l'ATPase à protons, permettant l'acidification du phagosome ; ce qui contribue à l'inhibition de la maturation des phagosomes et est associée à la survie des mycobactéries au sein des macrophages (Sturgill-Koszycki et al., 1994; Vergne et al., 2005; Yates et al., 2005; Zhai et al., 2019).

I.3.2.3 Blocage de la fusion phagosome-lysosome

Par ailleurs, les mycobactéries retiennent sur le côté cytoplasmique du phagosome une protéine de l'hôte « TACO » (protéine d'enveloppe riche en aspartate de tryptophane appelée aussi: coronin-1), ce qui probablement bloque le processus de phagocytose (Ferrari et al., 1999; Gatfield et al., 2005; Jayachandran et al., 2007) (figure 8). Les mycobactéries sont également capables de produire une protéine dite : la protéine kinase G (PknG) qui va inhiber la protéine kinase C α de l'hôte et ainsi

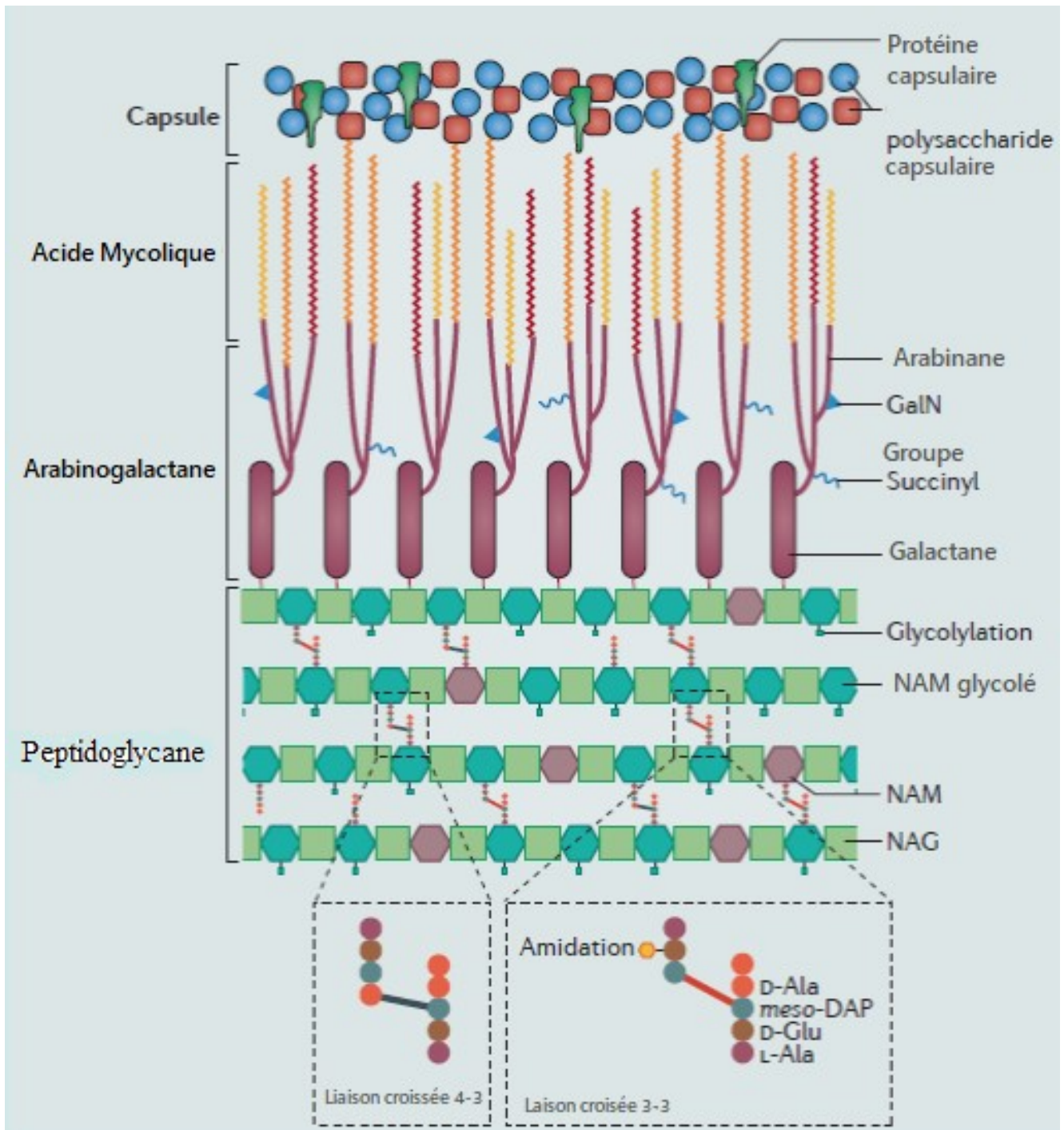


Figure 7| Paroi cellulaire de *Mycobacterium tuberculosis*.

La paroi cellulaire mycobactérienne est une structure complexe nécessaire pour la croissance, virulence et résistance aux antibiotiques. Elle est composée de trois macromolécules distinctes - peptidoglycane, arabinogalactane et acides mycoliques - qui sont entourés par une capsule externe lié de manière non covalente aux protéines et polysaccharides (Kieser and Rubin, 2014). NAM : acide N-acetyl muramique, NAG : N-acetyl glucosamine, meso-DAP : acide mesodiaminopimelique, D-Ala : D-alanine.

empêcher la fusion entre le phagosome et le lysosome (Chaurasiya and Srivastava, 2009; Houben et al., 2009; Walburger et al., 2004).

I.3.2.4 Résistance à la toxicité des réactifs azotés et oxygénés (RAO)

Des études ont montré que *Mtb* a développé plusieurs stratégies pour échapper à la toxicité aux réactifs azotés (RA). Il a été montré que *Mtb* peut bloquer le recrutement d'une protéine cytoplasmique (nitric oxide synthetase), ce qui conduit à l'inhibition du iNOS, et ainsi perturbe la production des RA (Miller et al., 2004). De plus, *Mtb* produit la protéine KatG (catalase-peroxidase) qui peut inactiver, dans le phagosome, les réactifs oxygénés (RO) (Li et al., 1998). D'autres études ont rapporté l'implication de certaines protéines de *Mtb* dans la neutralisation de l'effet toxique des RAO, par exemple la protéine codée par le gène mycobactérien *ahpC* (hydroperoxyde-réductase d'alkyle sous-unité C) qui agit conjointement avec d'autres protéines pour détoxifier l'anion peroxydite (Bryk et al., 2002).

I.3.2.5 Inhibition de l'apoptose

Les souches virulentes du *Mtb* peuvent bloquer l'apoptose des macrophages infectés, ainsi elles inhibent un mode de défense potentiel permettant de limiter la multiplication bactérienne et de faciliter la présentation d'antigènes. Le *Mtb* virulent induit la nécrose et donc à la dissémination de l'agent pathogène dans les poumons (Gan et al., 2008; Zhai et al., 2019). D'un autre côté, certaines protéines sécrétées par le *Mtb* fortement virulent, telles que la superoxyde dismutase, le peroxyde d'hydrogène /peroxydase (KatG), la sérine/thréonine protéine kinase (PknE), la NADH-quinone oxoreductase subunit G (NuoG) inhibent l'apoptose du macrophage (Danelishvili et al., 2010; Hmama et al., 2015; Miller et al., 2010). Ils agissent en régulant la production d'oxide d'azote et de cytokines pro-inflammatoires pour changer la relation avec les TLRs. Par conséquent, ils inhibent l'apoptose induite par le TNF- α et interfère avec les voies de la caspase (Hmama et al., 2015; Upadhyay et al., 2018), JAK2 / STAT1 (Rojas et al., 2002), TNF- α (Clay et al., 2008) et Bcl-2 pour

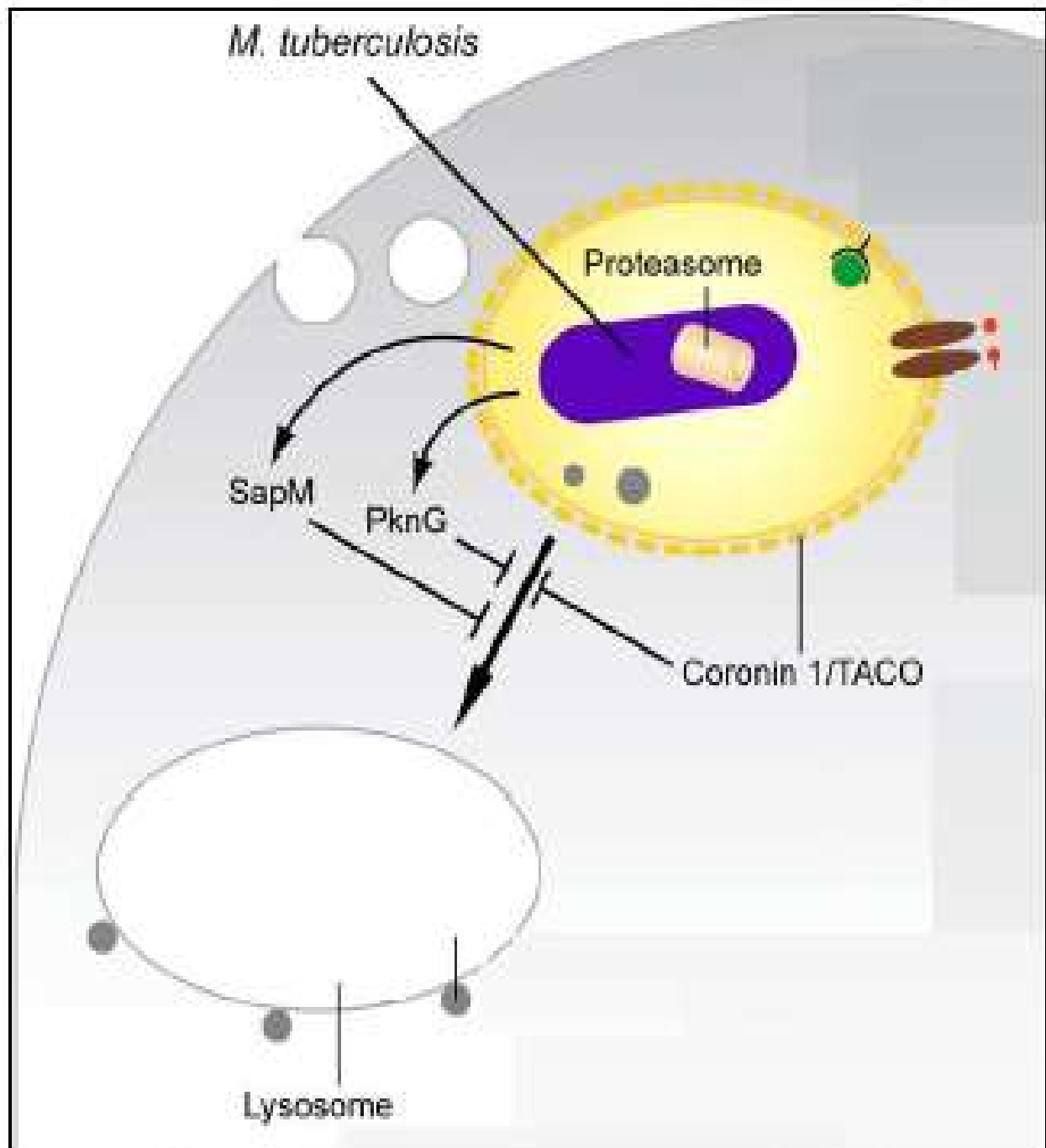


Figure 8 | Inhibition de la fusion du phagosome et du lysosome par *Mtb* (d'après (Pieters, 2008)).

Mtb sécrète la phosphatase SapM qui hydrolyse le PI3P, composant de la membrane du phagosome essentiel à la fusion. Par ailleurs, les LAM de la surface de *Mtb* inhibent la biosynthèse de PI3P. *Mtb* sécrète également la sérine/thréonine kinase PknG qui est essentielle à l'inhibition de la fusion du phagosome et du lysosome. Enfin, la Coronin 1 est recrutée et retenue à la surface du phagosome par *Mtb*. Elle active la calcineurine qui, une fois activée, participe à l'inhibition de la fusion du phagosome et du lysosome.

réduire l'apoptose des macrophages et augmenter le taux de survie des agents pathogènes (Sánchez et al., 2012; Zhai et al., 2019). De plus, le *Mtb* inhibe la voie intrinsèque de l'apoptose en bloquant la synthèse du TNF- α par les macrophages et ceci via l'induction de la production de la cytokine IL-10 (Balcewicz-Sablinska et al., 1998; Koul et al., 2004; Zhai et al., 2019).

I.3.2.6 Echappement du cytosol

Les souches virulentes de *Mtb* ont la capacité de s'échapper du phagosome dans le cytosol via le système de sécrétion de type VII ESX-1 (major virulence-associated type VII secretion system) (Houben et al., 2012; Simeone et al., 2012; van der Wel et al., 2007). Il semblerait que le système de sécrétion de protéines ESX-1, codé par les gènes de la région de différence 1 (RD1), joue un rôle dans cette faculté de dissémination des mycobactéries (Hsu et al., 2003; B.-R. Kim et al., 2019; Stanley et al., 2003). Le système ESX-1 code pour les protéines cruciales pour la virulence de *Mtb*, dont les principales sont ESAT-6 et CFP-10 qui sont capables d'induire la perforation de la membrane du phagosome conduisant à sa rupture complète, ce qui permet au bacille de s'échapper et de se disséminer dans d'autres cellules (Augenreich et al., 2017; Quigley et al., 2017; Simeone et al., 2012). La rupture phagosomale dérivée de ESX-1 peut entraîner une toxicité et une mort accrue des cellules hôtes, contribuant également à la virulence des mycobactéries pathogènes via une croissance bactérienne intracellulaire accrue (Aguilo et al., 2013; Augenreich et al., 2017; Majlessi and Brosch, 2015). L'utilisation de la translocation dans le cytoplasme par le *Mtb* représente un avantage certain pour le pathogène pour l'acquisition de nutriments indispensable à sa croissance et pour une meilleure dissémination (figure 9).

I.3.2.7 D'autres stratégies d'échappement aux mécanismes bactéricides

Le *Mtb* est capable de capturer le fer extracellulaire principalement par des chélateurs de fer dits les sidérophores. On trouve deux chélateurs: La carboxymycobactine (Gobin and Horwitz, 1996; Olakanmi et al., 2004) et la mycobactine (Rodriguez and Smith, 2006; Ryndak et al., 2010). En outre, le pathogène peut s'adapter à un environnement hypoxique (granulome) au manque d'oxygène et de nutriments (Deb et al., 2009; Via et al., 2008). En effet, le bacille induit l'expression de l'opéron DosR/DosS/DosT qui lui permettent le passage d'un métabolisme aérobie à un métabolisme anaérobie (dormance) (Park et al., 2003; Trauner et al., 2012). En outre, il peut utiliser les lipides et le cholestérol comme source de carbone (McKinney et al., 2000; Pandey and Sassetti, 2008).

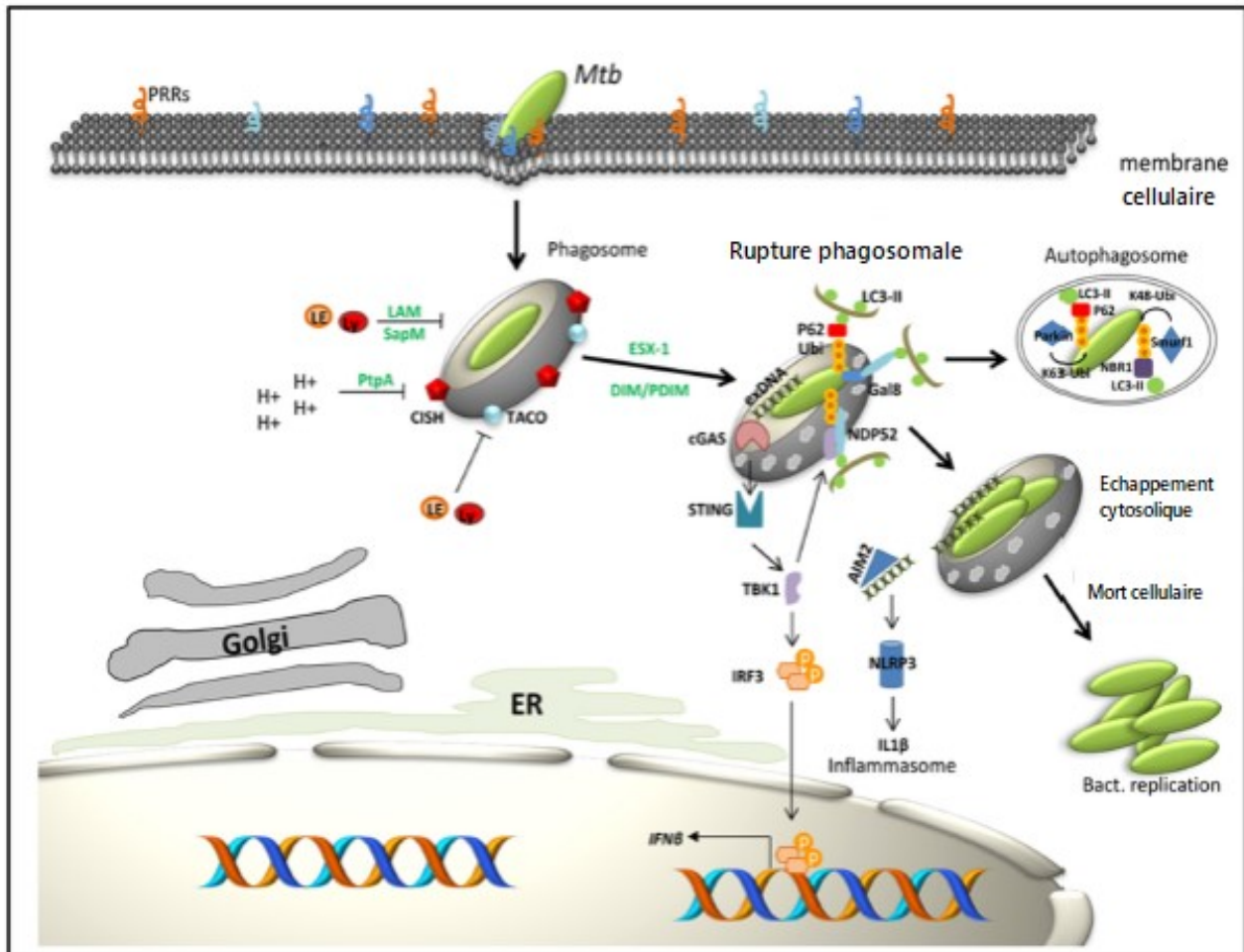


Figure 9 | Interactions de *Mtb* avec le phagosome de macrophages activés. L'interaction de *Mtb* avec les PRR de macrophages déclenche la phagocytose des bactéries. La première stratégie de *Mtb* pour conquérir les macrophages consiste à inhiber la maturation et l'acidification des phagosomes par l'expression ou la sécrétion de facteurs bactériens (LAM, SapM, PtpA) ou en renversant des voies de l'hôte telles que la signalisation TACO ou CISH. Les bactéries accèdent ensuite progressivement au cytosol par l'action du système de sécrétion ESX-1 et du DIM / PDIM. Lorsqu'elles sont en contact avec le cytosol, les bactéries sont ciblées par l'ubiquitine ligase (Parkin, Smurf1) et / ou activent des voies de reconnaissance cytosoliques spécifiques (gal8, cGAS ou AIM2). Cette dernière étape induit l'expression de l'IFN de type I, l'activation de l'inflammasome NLRP3 et l'initiation de l'autophagie. Enfin, le *Mtb* cytosolique induit des programmes de mort des cellules hôtes pour améliorer sa dissémination. En vert: facteurs bactériens; en noir: facteurs de macrophage (Queval et al., 2017).

I.4 Facteurs génétiques de susceptibilité à la tuberculose

L'implication des facteurs génétiques dans la prédisposition à la TB est largement démontrée dans la littérature. La première illustration dramatique à ce concept est fournie par les résultats de l'évènement "Lübeck 1926", où on a injecté accidentellement une souche virulente de *Mtb* au lieu du vaccin BCG. Sur les 251 enfants qui reçurent la même dose de mycobactérie, 77 décédèrent, 127 eurent des signes radiologiques de la maladie, tandis que 47 restèrent asymptomatiques (Dubos and Dubos, 1987).

Par ailleurs, les études de jumeaux ont montré un taux de concordance pour la maladie plus grand chez les jumeaux monozygotes (~ 60%) que chez les dizygotes (~ 35%) (Comstock, 1978).

D'autres arguments à l'implication des facteurs génétiques dans la prédisposition à la TB sont fournis par les observations épidémiologiques. Curieusement, seule une petite proportion (5 à 10%) des personnes exposées au *Mtb* développera des formes cliniques de la maladie alors que la majorité (90 à 95%) contrôlera l'infection qui reste latente.

De même, les fortes différences inter-éthniques ont également montré le rôle majeur des facteurs génétiques de l'hôte dans la réponse au *Mtb*. Une prévalence élevée de la TB a été observée dans les populations d'origine africaine par rapport à celles d'origine caucasienne (Stead et al., 1990a).

Pour identifier les gènes prédisposant à une maladie multifactorielle comme la TB, il faut d'abord définir les gènes candidats. Pour réaliser ceci, deux stratégies sont possibles (figure 9); La première c'est l'approche explorant le génome entier; Il peut s'agir d'études d'association génome entier (étude GWAS (Genome Wide Association study)), d'études d'expression pangénomique (études du transcriptome), études de liaison génétique et des études de séquençage direct du génome.

Alors que la deuxième stratégie, c'est l'approche théorique qui vise à définir des gènes candidats "par hypothèse" en se basant sur les connaissances a priori ou fonction supposée d'un gène. Dans le contexte de la TB c'est les gènes impliqués dans la réponse immunitaire.

Une fois que les gènes sont définis, l'investigation se poursuit pour détecter le ou les variants génétiques (mutations) pouvant prédisposer à la maladie. Quand la prédisposition est due à de mutations rares, on parle d'une prédisposition monogénique ou prédisposition génétique mendélienne, en opposé on parle d'une prédisposition génétique complexe ou polygénique lorsqu'il s'agit des polymorphismes plus fréquents ayant un effet plus modéré sur le risque de la maladie.

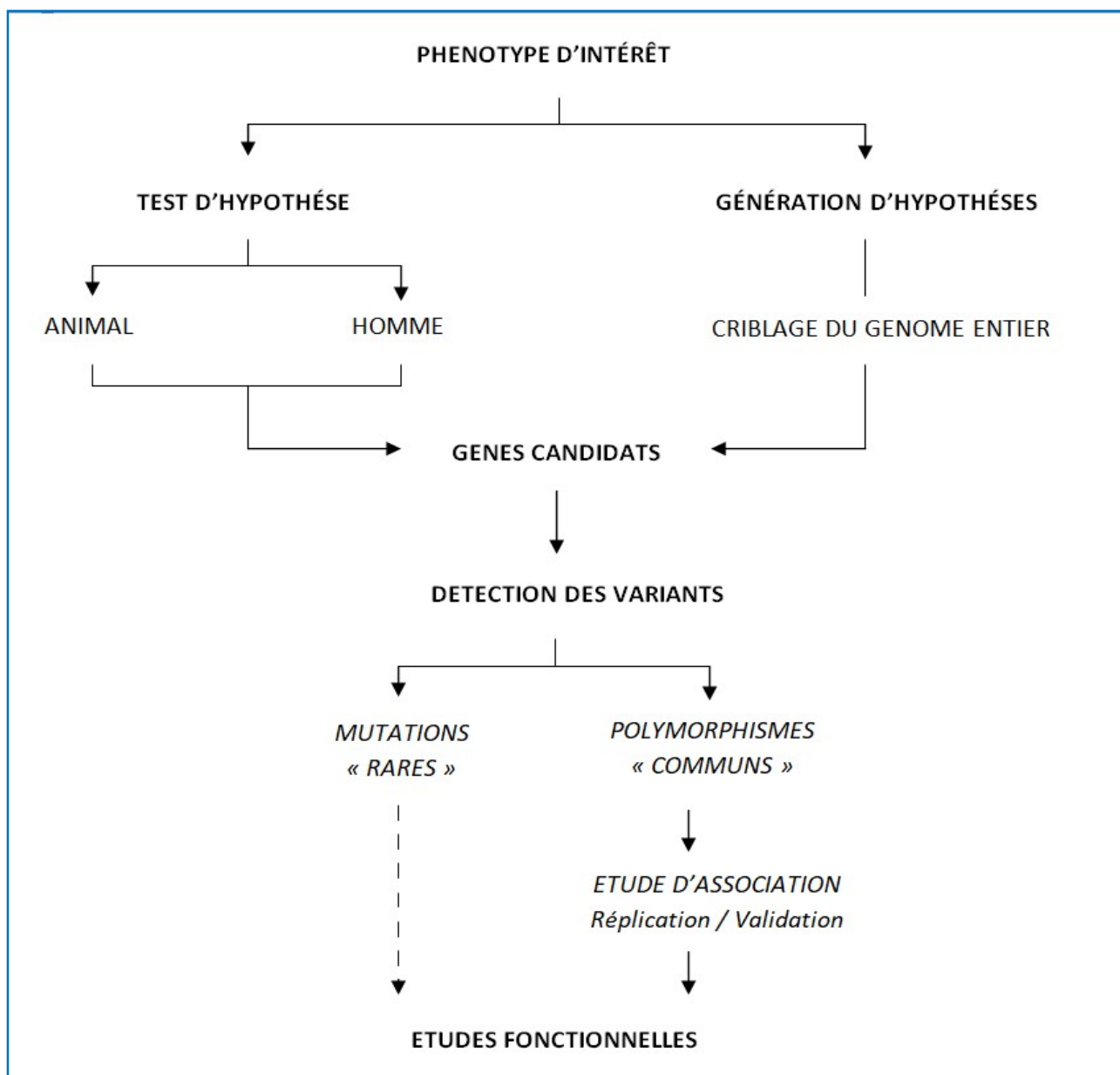


Figure 10 | Stratégie générale de la recherche des gènes de susceptibilité dans une maladie multifactorielle comme la TB.

L'approche dite « test d'hypothèses » consiste à sélectionner des gènes candidats sur la base d'observations et d'études réalisées chez l'Homme ou l'animal. Alors que l'approche dite « génération d'hypothèses » consiste à identifier des gènes candidats en criblant dans un premier temps l'ensemble du génome (modifié à partir de Gaschignard et al., 2013).

Dans le cas de la TB, il semblerait que la prédisposition génétique à la maladie présente plusieurs aspects. L'hypothèse du spectre continu dans le contrôle génétique de la TB clinique a été proposée. Elle suggère que la prédisposition génétique à la TB est dépendante de l'âge (figure 11), ainsi elle est polygénique et complexe faisant impliquer plusieurs variants génétiques à effet modéré, chez l'adulte. En opposé, le contrôle génétique est simple et monogénétique à effet fort, chez l'enfant, où il y a une relation de cause à effet entre certains variants génétiques rares et la TB sévère. Ces deux aspects de prédisposition génétique à la TB constitue les deux extrémités d'un spectre continu qui passe par l'effet du gène majeur (Abel et al., 2018, 2014; Casanova and Abel, 2013; Alcaïs et al., 2005; Greenwood et al., 2000; Abel and Casanova, 2000).

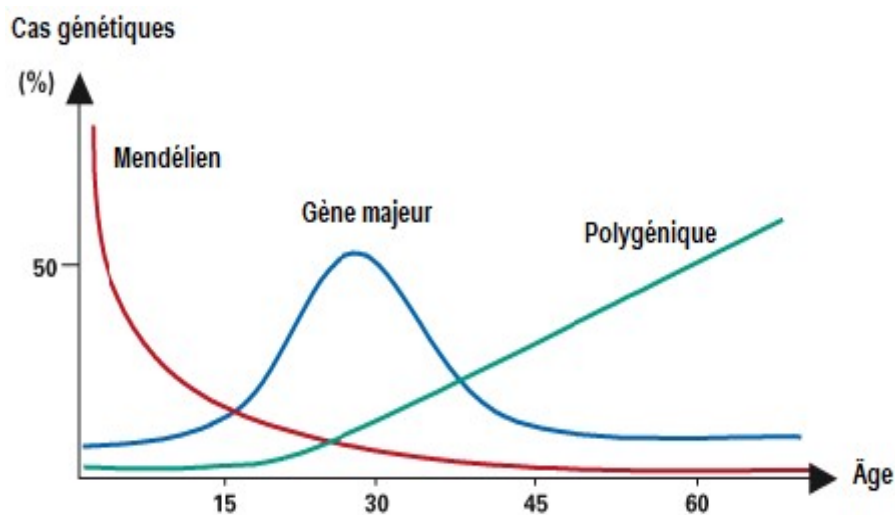


Figure 11| Spectre de prédisposition génétique à la tuberculose en fonction de l'âge des patients

En effet, les études de génétique mendélienne ont pu démontrer chez l'enfant, une relation causale entre un syndrome rare appelé: le syndrome de prédisposition sélective à des infections par des mycobactéries peu virulentes (MSMD: Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases) et certaines mutations rares de sept gènes autosomaux: *IFNGR1*, *IFNGR2*, *STAT1*, *IL12RB1*, *IL12B*, *IRF8*, *ISG15* et deux gènes sur le chromosome X: *NEMO* et *CYBB* (Bogunovic et al., 2012; Bustamante et al., 2011a; Filipe-Santos et al., 2006a; Hambleton et al., 2011). Ces mutations affectent la boucle d'activation existant entre l'IL-12, l'IL-23 et l'IFN- γ (Filipe-Santos et al., 2006a; Hambleton et al., 2011). De façon plus intéressante, il a été remarqué que plusieurs patients qui sont porteurs de ces mutations ont présentés la TB (Altare et al., 2001; Boisson-Dupuis et al., 2011; Dorman et al., 2004; Fieschi et al., 2003; Jouanguy et al., 1997; Picard et al., 2002). Cette observation est fascinante puisqu'elle a démontré que la TB de l'enfant, souvent sévère et extra-

pulmonaire pouvait révéler une prédisposition mendélienne (Abel et al., 2014; Alcaïs et al., 2005; Casanova and Abel, 2002).

Par ailleurs, chez l'adulte l'infection tuberculeuse est souvent limitée aux poumons et reflète la réactivation de la TB latente à partir d'une primo-infection asymptomatique (Alcaïs et al., 2005). D'innombrables études d'associations, dont le principe général est de comparer la fréquence des polymorphismes entre des sujets malades et des sujets sains, ont été menées chez l'adulte. Malheureusement, les résultats rapportés sont parfois peu convaincants. De plus, plusieurs gènes candidats par hypothèse ont été investigués par des études d'associations, dont les résultats ont permis d'associer beaucoup de variants génétiques à la TB chez des populations différentes. Nous citons principalement le gène *NRAMP1*, le système HLA (HLA-DR2, DQB1), *VDR*, *l'INF-γ*, *DC-SIGN (CD209)*, les récepteurs *TLR1* et *TLR2* (tableau 1).

Au Maroc, de nombreuses études génétiques ont été menées afin d'évaluer l'impact de plusieurs polymorphismes sur la susceptibilité ou la résistance à la TB. A ce propos, plusieurs études cas-témoin ont été réalisées dans la population marocaine (tableau 2).

Cependant les résultats sont peu convaincants, voir même contradictoires des fois, ce qui rend leur interprétation plus difficile (Azad et al., 2012; Möller et al., 2010).

D'autres stratégies ont été utilisées pour étudier la question de la prédisposition génétique de la TB chez l'adulte. Il s'agit des approches explorant le génome entier. Dans ce contexte trois études GWAS ont été réalisées pour l'instant. La première a été réalisée sur une population gambienne et ghanéenne et n'a identifié qu'un seul variant situé dans la région chromosomique 18q 11, associé à la susceptibilité de développer une TB pulmonaire (Thye et al., 2010). Un second polymorphisme appartenant à la région 11p13, le rs2057178 a été investigué chez quatre populations ghanéenne, gambienne, indonésienne et russe. Ce variant génétique a été associé à la protection contre la TB chez les individus ghanéens, les gambiens et les russes or aucune association n'a été détectée chez les indonésiens (Thye et al., 2012). Une autre étude GWAS réalisée chez des populations asiatiques a permis d'identifier un locus situé dans la région chromosomique 20q12 comme étant associé au risque de développer la TB mais uniquement chez des sujets jeunes (Mahasirimongkol et al., 2012). De façon plus intéressante, une étude de liaison génétique avec criblage complet du génome entier a été réalisée sur une population Marocaine et dont les résultats ont permis d'identifier un locus de susceptibilité majeur à la TB dans la région 8q12-13 (Lod score=3,49, $p=3 \times 10^{-5}$), indiquant la présence d'un gène majeur ou un groupe de gène de susceptibilité à la TB (Baghdadi et al., 2006). En outre, il a été rapporté que deux variants génétiques du gène *TOX* sont fortement associés à la TB pulmonaire chez les sujets jeunes (ayant développés la TB avant 25 ans) (Grant et al., 2013). La réalisation d'une exploration génétique de cette région chromosomique, est d'un intérêt majeur pour identifier le ou les gènes impliqués dans le contrôle génétique de la TB.

En se basant sur leurs rôles importants dans la réponse immunitaire, nous avons sélectionné deux genes candidats par hypothèse localisés dans la région 8q12-13. Il s'agit du gène *CYP7A1* (Cytochrome P450 sous famille A membre 1) et du gène *NSMAF* (Neutral sphingomyelinase activation associated factor).

Tableau 1. Associations des variants génétiques de certains gènes avec la TB.

	Gènes	Génotype/Allèle	Association avec la TB	Population	p-value	OR (95 % CI)	Références
HLA gènes	HLA	DRB1*1202	Nég	Indonésienne	0.0008	0.32 (0.16-0.64)	Yuliwulandari et al., 2010
		DQB1*0601		Indienne	0.008	2.32 (1.29-4.27)	Ravikumar et al., 1999
Récepteurs	NRAMP1 (SLC11A1)	INT4 G /C	Pos	Ouest africaine	0.009	1.83 (1.22-2.75)	Bellamy et al., 1998
				Ouest africaine	<0.001	1.85(1.35-2.54)	Bellamy et al., 1998
		3'UTR	Pos	Coréenne	0.02	1.845 (1.097-3.104)	Ryu et al., 2000
				Chinoise de Han	0.03	1.89 (1.171-3.051)	Liu et al., 2004
				Ouest africaine	0.008	1.85 (1.20-2.85)	Bellamy et al., 1998
		D543N	Pos	Chinoise de Han	0.041	2.59 (1.043-6.434)	Liu et al., 2004
				Tunisienne	0.003*	1.85 (1.2-2.88)	Ben-Selma et al., 2012
				Sud africaine	0.01	1.48 (1.08-2.02)	Barriero et al., 2006
		-336G	Pos	Africaine Sub-Saharienne	0.006	0.86 (0.77-0.96)	Vannberg et al., 2008
		-871A	Pos	Sud africaine	8,2×10 ⁻⁴	1.85 (1.29-2.66)	Barriero et al., 2006
	CD209 (DC-SIGN)	Fok T/C (rs10735810)	Pos	Chinoise de Han	0.002	2.345(1.222-4.499)	Liu et al., 2004
		Taq C/T (rs731236)	Nég	Gambienne	0.01	0.53 (0.31-0.88)	Bellamy et al., 1999
		Bsm A/G (rs1544410)		Turque	0.000	1.61 (1.23-2.11)	Ates et al., 2011
Cytokines & chemokines	IFN-γ	Arg753Glu	Pos	Turque	0.019	5.55 (1.68-18.34)	Ogus et al., 2004
		Arg677Trp	Pos	Tunisienne	<0.001	—	Ben-Ali et al., 2004
	TNF-α	+874A	Pos	Sud africaine	0.0055	1.64 (1.16-2.30)	Roussouw et al., 2003
				Brésilienne	<0.0001	1.64–3.22	Vallinoto et al., 2010
		-238GG	Pos	Iranienne	0.0009	1.70 (5.45-19.34)	Amirzargar et al., 2006
		-857 C/T	Nég	Chinoise	0.001	0.68 (0.53– 0.86)	Ma et al., 2010

Enzymes	<i>MIF</i>	-173 C	Pos	Colombienne	0.02	1.64 (1.07–2.52)	Gomez et al., 2007
				Iranienne	0.028	1.63 (1.07-2.48)	Hashemi et al., 2014
				Chinoise du sud-ouest	<0.001	2.12 (1.45–3.10)	Li et al., 2012
	<i>IL-12</i>	P40 intron 2-repeat marker (ATT) ₈	Pos	Chinoise de Hong Kong	<0.001	2.14 (1.45-3.19)	Tsoet al., 2004
	<i>MCP-1(CCL2)</i>	-2581G (alias : -2518A/G ; rs1024611)	Pos	Mexicaine	0.0026	2.45 (1.88–3.19)	Flores-Villanueva et al., 2005
			Pos	Coréene	0.0001	2.63 (1.85–3.73)	Thye et al., 2009
			Nég	Ghanéene	0.0002	0.81 (0.73–0.91)	Thye et al., 2009
	-362C	Nég	Ghanéene	0.000019	0.83 (0.76–0.90)	Thye et al., 2009	
<i>PTPN22</i>	1858T	Pos	Nég	Colombienne	0.04	0.3 (0.08–1.04)	Gomez et al., 2005
	<i>MBL</i>	G875A Exon1		Indienne	0.02	3.85 (1.66-8.88)	Vaid et al., 2006
	G57D Exon1	Nég	Gambienne	0.037	0.79 (0.64–0.99)	Bellamy et al., 1998b	

Tableau 2. Polymorphismes de gènes candidats associés à la prédisposition à TB chez la population marocaine.

Gènes/ Polymorphisme	Association avec la TB	p-value	OR	Références
<i>TLR2</i> /+597CT	Négative	0.016	0.65 (0.45-0.94)	Arji et al., 2014
<i>TLR4</i> /+7263C	Positive	0.021	1.63 (1.06-2.57)	
<i>MIF</i> /-173CC	Positive	0.02	1.53 (1.05-2.24)	Sadki et al., 2010
<i>MCP-1</i> /-2518GG	Négative	0.016	0.35 (0.13-0.86)	Arji et al., 2012
<i>PTPN22</i> /1885T	Négative	0.01	0.14 (0.01-0.93)	Lamsyah et al., 2009
<i>VDR</i> (f-b-a-T) haplotype	Négative	<0.00001	0.18 (0.09-0.35)	Arji et al., 2014
<i>IL-12Rβ1</i>				Remus et al., 2004
-111A/ T	Négative	0.019	2.03 (1.04–4.04)	
-2C/T	Positive	0.013	2.69 (1.19–6.09)	
STAT4 rs897200 GG	Négative	0.019	1.35 (1.05-1.74)	Sabir et al., 2014

I.5 Le gène *NSMAF* (Neutral sphingomyelinase activation associated factor)

Le gène *NSMAF* est localisé au niveau de la région 8q12.1, entre 59496063 et 59572403 Kb chez l'homme (figure 12), et il est constitué de 31 exons et 30 introns. Le gène code pour la protéine FAN (Factor associated with neutral sphingomyelinase activation) (Adam-Klages et al., 1996).

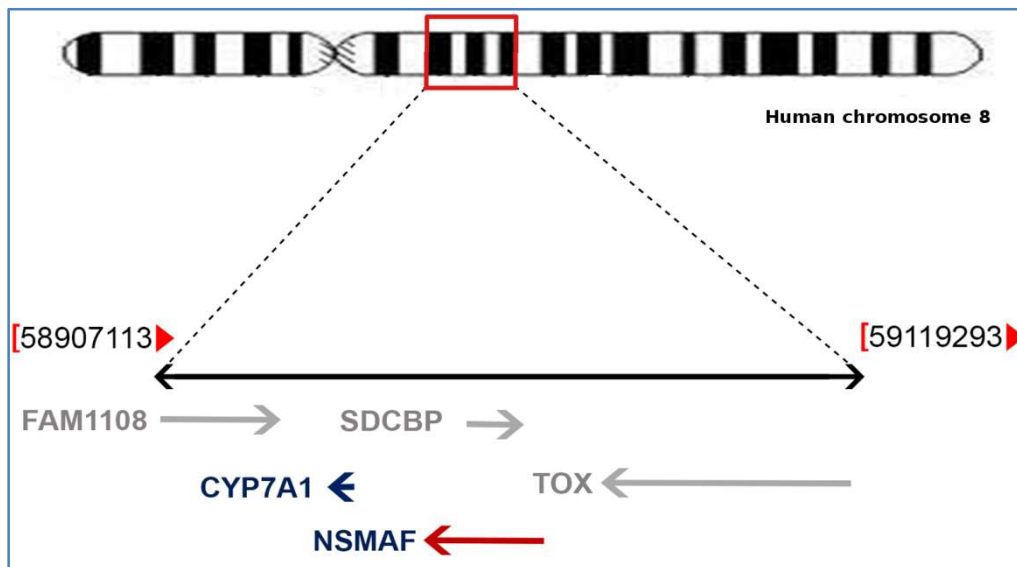


Figure 12 | Schéma représentatif montrant la localisation du gène *NSMAF* dans le chromosome 8 (modifié à partir du NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>).

Le gène *NSMAF* est localisé dans la région chromosomique 8q12.13, tout près des gènes *TOX* et *CYP7A1*.

I.5.1 Structure de la protéine FAN

La protéine humaine FAN est constituée de 917 acides aminés, avec une masse moléculaire de 104 KDa. L'analyse de séquence de la protéine a permis sa classification au sein de la famille des protéines à répétition qui se composent principalement de protéines régulatrices (Adam-Klages et al., 1998, 1998). Ainsi, la partie C-terminale révèle la présence de cinq domaines répétés WD riches en tryptophane et en acide aspartique (Adam-Klages et al., 1998). Ces domaines WD sont nécessaires pour l'interaction de la protéine avec le domaine NSD (neutral sphingomyelinase domain) du TNFR-1 (tumor necrosis factor- receptor), ainsi qu'avec une autre protéine à répétition RACK1 (receptor for activated C kinase 1) qui participe aux fonctions cellulaires de FAN par le recrutement de la PKC (protéine kinase C). Le domaine effecteur de FAN est localisé au niveau de la partie N-terminale, il contient deux domaines : BEACH (beige and cheidiak-Higashi) et PH (pleckstrin homology) (Jogl et al., 2002). Ce dernier (PH) se lie spécifiquement à la PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ou PtdIns(4,5) P2), permettant la localisation de FAN au niveau de la membrane plasmique (Haubert et al., 2007). Le domaine BEACH interagit

physiquement et fonctionnellement avec le domaine PH, les deux sont nécessaires pour l'activation induite par le TNF des sphingomyélinases neutre 2 et 3 (Jogl et al., 2002) (figure 13).

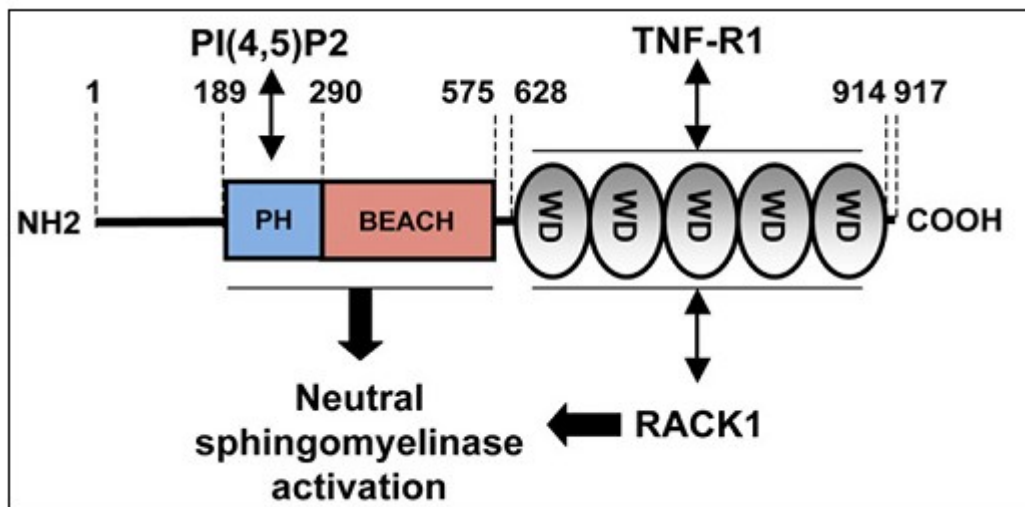


Figure 13 | Structure de la protéine FAN (Montfort et al., 2010b)

La protéine FAN possède, au niveau de sa portion carboxy-terminale, cinq domaines riches en tryptophane et en acide aspartique (domaines WD), qui interagissent avec le domaine NSD (neutral sphingomyelinase domain) du récepteur I du TNF (TNF-R1). Le domaine N-Terminal de FAN est composé du domaine PH qui se lie à PIP2, ainsi que le domaine BEACH. Les deux interagissent physiquement et fonctionnellement pour l'activation de N-Smase.

Il est aussi important de noter que l'implication de la protéine FAN dans le processus de la mort cellulaire ne se limite pas uniquement à son interaction seule avec le TNFR-1, la protéine FAN interagit physiquement et fonctionnellement avec le CD40 qui possède des domaines homologues du NSD ce qui déclenche la voie du céramide (Sánchez et al., 2001; Ségui et al., 1999).

I.5.2 Rôle de la protéine FAN:

I.5.2.1 Rôle de la protéine FAN dans le déclenchement de la sphingomyélinase neutre et la signalisation apoptotique

C'était en 2001, que l'équipe de Ségui et al. a rapporté pour la première fois que la protéine FAN est impliquée dans l'apoptose induite par le TNF dans les fibroblastes humains et de souris (Ségui et al., 2001). Par la suite, ce rôle a été démontré grâce aux travaux de Gores et al. dans des cellules hépatiques de rat (Werneburg et al., 2004).

Le déclenchement des voies de signalisation conduisant à l'apoptose implique le TNF- α qui se lie spécifiquement à deux récepteurs distincts: TNF-R1 (CD120a) (55 kDa) et TNF-R2 (CD120b) (75 kDa) (Männel and Echtenacher, 2000). Un des mécanismes maintenant bien connu est le

recrutement par l'intermédiaire du domaine de mort du TNF-R1 de protéines adaptatrices qui elles-mêmes recrutent la pro-caspase 8.

La plupart des voies de signalisation engageant le TNF- α , dépendent de sa capacité à activer le TNF-R1 (Montfort et al., 2010b). Ce dernier a une structure particulière constituée de deux régions importantes: la première est le domaine de mort (death domain), qui est une séquence de 80 acides aminés considérée comme indispensable au déclenchement de l'apoptose induite par le TNF, il intervient dans l'activation de la voie pro-inflammatoire (Micheau and Tschopp, 2003; Schneider-Brachert et al., 2004). La deuxième région est le domaine NSD (neutral sphingomyelinase domain), qui se lie spécifiquement à la protéine FAN (Adam et al., 1996). Cette interaction induit à l'activation des sphingomyélinases neutres 2 et 3 ce qui déclenche l'activation de la voie «sphingomyéline-céramide» qui consiste en l'hydrolyse transitoire de la sphingomyéline (figure 14) par une sphingomyélinase conduisant ainsi à la production de la céramide (figure 15) (Levade and Jaffrézou, 1999). Ce dernier est un second messenger sphingolipidique impliqué dans la régulation de la différenciation cellulaire, la prolifération et participe à l'induction de l'apoptose via l'activation des caspases par un mécanisme dépendant du relargage du cytochrome C dans le cytosol (Cuvillier et al., 2000) (figures 16 et 17).

En effet, une expression stable dans les fibroblastes humains d'une forme dominante négative de FAN atténue l'activation des caspases et la libération du cytochrome c des mitochondries et inhibe fortement la mort cellulaire déclenchée par le TNF- α .



Figure 14 | Structure chimique de la sphingomyéline (Young et al., 2012)

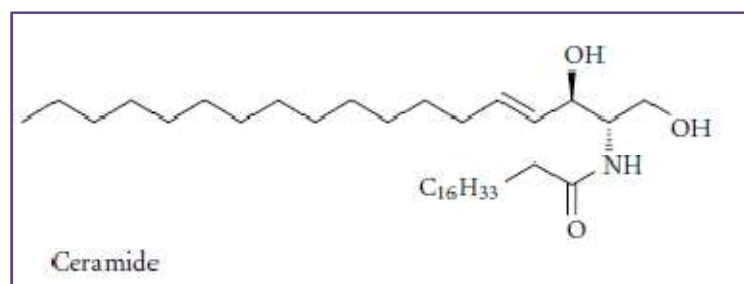


Figure 15 | Structure chimique de la céramide (Young et al., 2012)

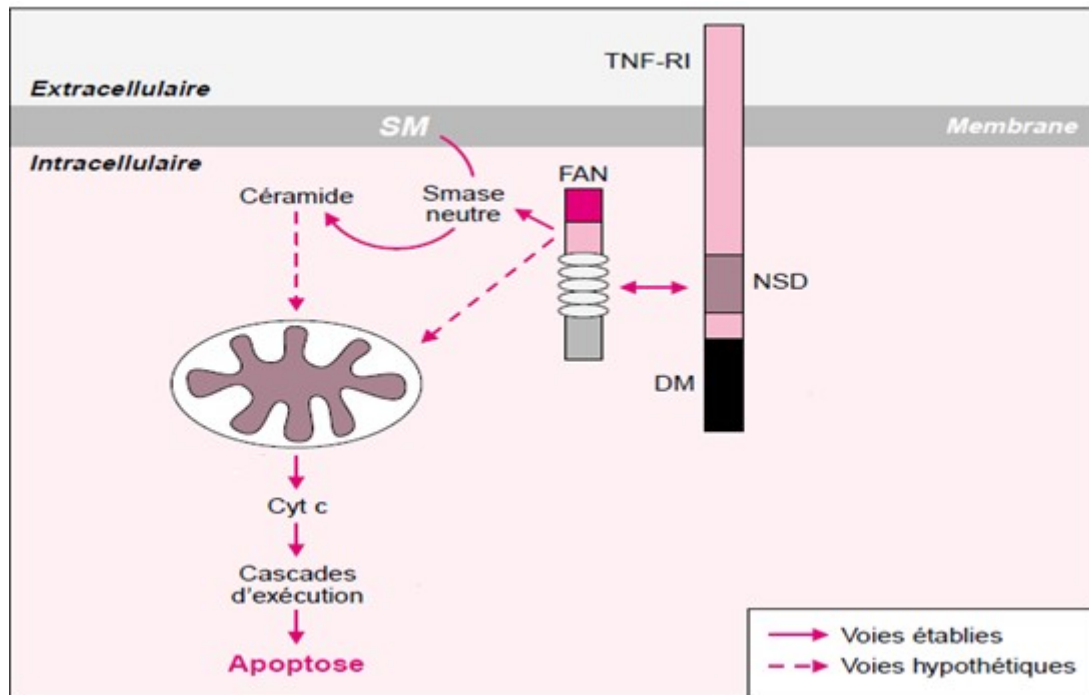


Figure 16 | Interaction de la protéine FAN avec le TNFR1 et son rôle dans la signalisation pro-apoptotique (Ségui et al., 2001). La protéine FAN par son domaine effecteur, se lie spécifiquement au domaine NSD du récepteur TNFR-1, ce qui déclenche une activation de la SMase neutre. La SMase neutre hydrolyse la sphingomyéline en céramide. La céramide produite pourrait contribuer à la libération du cytochrome C dans le cytosol et activer la cascade apoptotique.

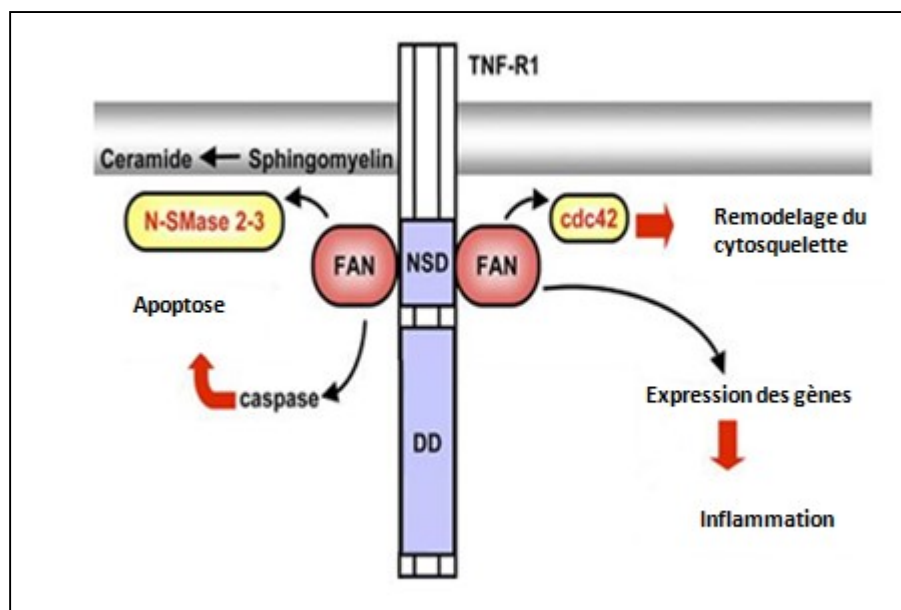


Figure 17 | Rôle de FAN dans les voies de signalisation impliquant le récepteur TNFR1 (Montfort et al., 2010b). La protéine FAN se lie avec le domaine NSD du TNF-R1 et stimule les N-Smases 2 et 3, ce qui active la voie « sphingomyéline-céramide ». En plus, la protéine FAN est nécessaire pour l'activation du CDC42 et le remodelage du cytosquelette. FAN est impliquée également dans la modulation de l'expression des gènes pro-inflammatoires ainsi que dans l'activation de la cascade des caspases qui déclenche le processus de mort cellulaire programmée.

I.5.2.2 Implication de la protéine FAN dans l'inflammation et dans les réponses immunitaires

Outre son rôle dans l'activation des sphingomyélinases 2 et 3 et son implication dans l'induction du processus apoptotique dépendent du TNF- α , la protéine FAN semble aussi être impliquée dans la signalisation inflammatoire. Des études faites sur des fibroblastes de souris (MEFs) expriment le récepteur TNF-R1 humain de type sauvage ou le TNF-R1 sans NSD (Neumeyer et al., 2006), ont montré que l'expression de certains cytokines pro-inflammatoires est médiée en partie par TNF-R1 NSD (Montfort et al., 2009). En fait la délétion du NSD perturbe l'expression génétique induite par le TNF- α . En outre, dans les MEF déficients en FAN, l'expression génique pro-inflammatoire induite par le TNF- α a été sélectivement modifiée (Montfort et al., 2009). La protéine FAN est nécessaire pour l'expression des gènes codants pour CXCL2 (C-X-C motif chemokine 2) et l'Il-6 (Montfort et al., 2009). En effet, on a remarqué que par rapport aux souris sauvages, la réponse humorale des souris déficientes en FAN, était faible et qu'elle était associée à une réduction du nombre de leucocytes y compris les macrophages, les neutrophiles, les cellules dendritiques, suggérant ainsi, l'implication de la protéine FAN dans le recrutement des leucocytes et dans l'établissement de la réponse immunitaire spécifique (Montfort et al., 2009). Le mécanisme moléculaire par le quel FAN module les réponses immunitaires n'est pas encore élucidé.

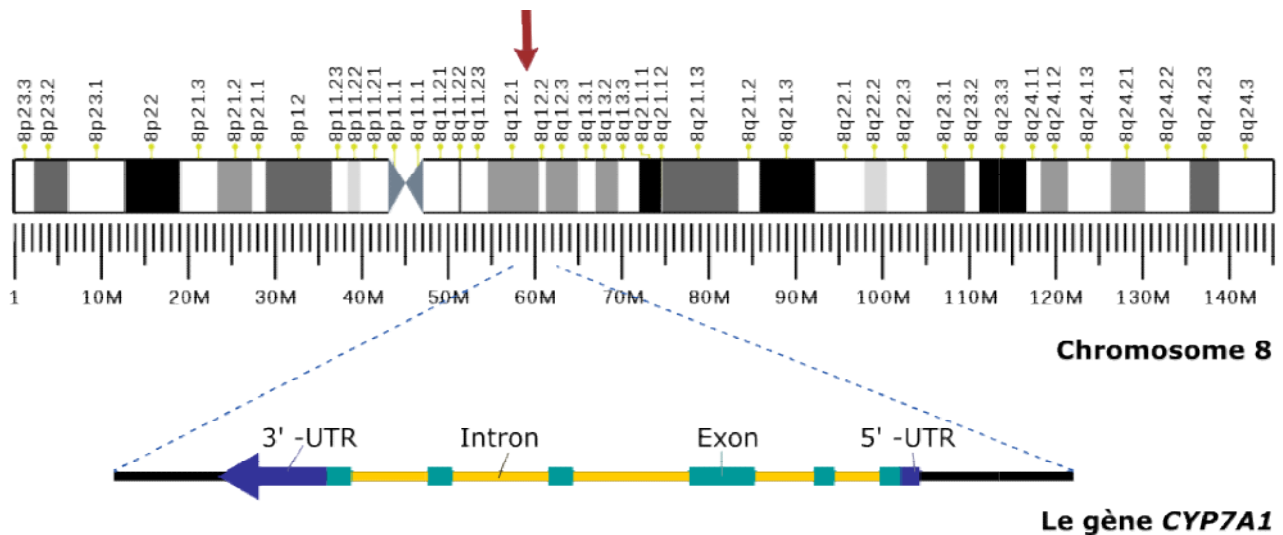
I.5.2.3 D'autres rôles physiologiques de la protéine FAN

Le rôle de la protéine FAN ne se limite pas uniquement à l'implication dans le processus de la mort cellulaire programmée et la modulation des réponses immunitaires et inflammatoires. En effet, des études menées sur des souris déficientes en FAN ont présenté une augmentation de la perte d'eau trans épidermique et une cinétique de récupération retardée après rupture de la barrière cutanée, qui était associé à une prolifération réduite des kératinocytes (Kreder et al., 1999a). Par ailleurs, il a été rapporté que la protéine FAN peut moduler les filaments d'actine en réponse au TNF- α (Haubert et al., 2007; Peppelenbosch et al., 1999a). Cette modulation est dépendante de l'activation du cdc-42 et non pas du Rac et Rho, puisque son activation est altérée par l'absence de FAN (figure 17) (Haubert et al., 2007). De plus, une étude a rapporté que la protéine FAN pouvait réguler la migration des neutrophiles en réponse au TNF- α (Montfort et al., 2009).

Par ailleurs, la protéine FAN semble intervenir dans la régulation de la perméabilité lysosomale et la libération de la cathepsine B ; En effet, il a été rapporté que la surexpression d'un dominant négatif de la protéine FAN a altéré l'activation de la caspase et a augmenté la perméabilité lysosomale et la libération de la cathepsine par le lysosome (Werneburg et al., 2004). Les mécanismes par lesquels FAN assure ses rôles physiologiques restent à établir.

I.6 Le gène *CYP7A1* (Cytochrome P450 sous famille A membre 1)

Le *CYP7A1* est un gène localisé dans la région q12.1 du chromosome 8. Il s'étend sur 9,98 kb. Il contient 6 exons, 5 introns, une région 5'-UTR, et une région 3'-UTR (Cohen et al., 1992) (figure 18). Il code pour une enzyme nommée: cholestérol 7 α -hydroxylase (CYP7A1).



I.6.1 Régulation transcriptionnelle du gène *CYP7A1*

La régulation de l'expression du gène est complexe; elle est assurée par l'interaction au niveau du promoteur, avec de nombreux facteurs de transcription et récepteurs nucléaires (Tableau 3), notamment HNF4 α (hepatocytenuclear factor 4 alpha), (Cooper et al., 1997), FTF (alpha(1)-fetoprotein transcription factor) (del Castillo-Olivares and Gil, 2000), SHP (small heterodimer partner) (Goodwin et al., 2000; Lu et al., 2000), and PGC-1 α (peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1 α) (Bhalla et al., 2004; Ponugoti et al., 2007; Shin et al., 2003), LRH-1 (liver receptor homolog 1) (Goodwin et al., 2000; Lu et al., 2000), FoxO1 (forkhead transcription factor O1) (Park and Pak, 2011), FXR (farnsoïd X receptor) (Chiang et al., 2000), PXR (pregnane X receptor ou SXR (connu également sous le nom de steroid and xenobiotic sensing nuclear receptor) (Copples and Li, 2016), and VDR (vitamin D3 receptor) (Chiang, 2005; Chow et al., 2014; Han and Chiang, 2009).

En fait, la région promotrice du gène *CYP7A1* est un exemple typique du promoteur liant l'ARN polymérase II avec une boîte TATA (Fang, 2017; Molowa et al., 1992). L'analyse cartographique de ce promoteur a identifié, en amont de la boîte TATA, la présence de deux régions BARE (bile acid-

responsive element) I et II potentielles contenant des sites de liaison de plusieurs facteurs de transcription (Chiang and Stroup, 1994).

Par ailleurs, il est important de noter que l'expression de *CYP7A1* est modulée par plusieurs effecteurs endogènes ou exogènes. Parmi eux on trouve les vitamines liposolubles A et D (Chow et al., 2014; Jahn et al., 2016; Saeed et al., 2017; Schmidt et al., 2010). En effet, la vitamine A interagit avec les RARs (retinoic acid receptors) et/ou RXR (retinoid x receptor) (Mangelsdorf et al., 1995) et induit l'expression FXR-dépendante du FGF19 (fibroblast growth factor 19) conduisant à la répression du gène *CYP7A1* (Schmidt et al., 2010). La vitamine A peut stimuler la synthèse du FGF19 de façon directe en interagissant avec le gène *FGF19* (Jahn et al., 2016). De même, la vitamine D est capable d'inhiber l'expression du *CYP7A1* via l'interaction avec son récepteur le VDR (voir la régulation par le VDR) (Chow et al., 2014; Schmidt et al., 2010).

D'autres régulateurs endogènes semblent jouer un rôle important dans la régulation de la transcription du gène *CYP7A1*, tel que: le glucose (Li et al., 2010), les glucocorticoïdes (Xiao et al., 2016), les hormones thyroïdiennes (Drover and Agellon, 2004; Ellis, 2006), le glucagon (Song and Chiang, 2006), l'insuline (Park and Pak, 2011; Twisk et al., 1995) et surtout les acides biliaires (Chiang and Stroup, 1994; Chiang, 2013a; Juřica et al., 2016). Dans ce contexte, il a été rapporté que les acides biliaires hydrophobes sont de puissants inhibiteurs de la transcription du *CYP7A1*. Cette répression est assurée par le biais des régions très conservées, BARE I et II qui sont des éléments de réponse aux acides biliaires (Chiang et al., 2000; Chiang and Stroup, 1994; Chiang, 2013b; Fang, 2017; Li and Chiang, 2014a). Les acides biliaires sont les ligands physiologiques du récepteur nucléaire FXR (Fang, 2017; Makishima et al., 1999; Tu et al., 2000). Le FXR activé par les acides biliaires induit l'expression du gène codant pour le SHP qui agit comme un répresseur transcriptionnel au niveau du promoteur du gène *CYP7A1* (figure 19) (Chiang, 2002; Edwards et al., 2002; Han, 2018; Li-Hawkins et al., 2002; Lu et al., 2000). FXR induit dans l'intestin le FGF19 (FGF19 chez l'homme; FGF15 chez la souris), qui active le récepteur hépatique FGFR4 (fibroblast growth factor receptor 4). Lors de l'activation de ce dernier, la voie de signalisation kinase c-Jun NH (2) -terminale (JNK) est active, à son tour elle supprime l'expression du gène *CYP7A1* pour réduire la synthèse des acides biliaires dans le foie (figure 20) (Byun et al., 2018; Camilleri and Gores, 2015; Inagaki et al., 2005; Kliewer and Mangelsdorf, 2015).

En revanche, le gène *CYP7A1* peut être réprimé indépendamment du FXR (figure 21). En effet, l'acide lithocholique (acide biliaire secondaire) (LCA) est un ligand de PXR et VDR. Ces deux récepteurs peuvent se lier à la séquence BARE-I du promoteur du *CYP7A1*. Le PXR interagit avec HNF4α et bloque son recrutement du co-activateur PGC-1α, causant une inhibition de la transcription (Han, 2018; Han and Chiang, 2009; Li and Chiang, 2005). En plus, il a été rapporté qu'un récepteur nommé CAR (constitutive androstane receptor) se lie au promoteur *CYP7A1* et

entre en compétition avec HNF4 α pour les coactivateurs PGC-1 α et le récepteur des glucocorticoïdes aboutissant à une inhibition de la transcription du *CYP7A1* (Miao et al., 2006).

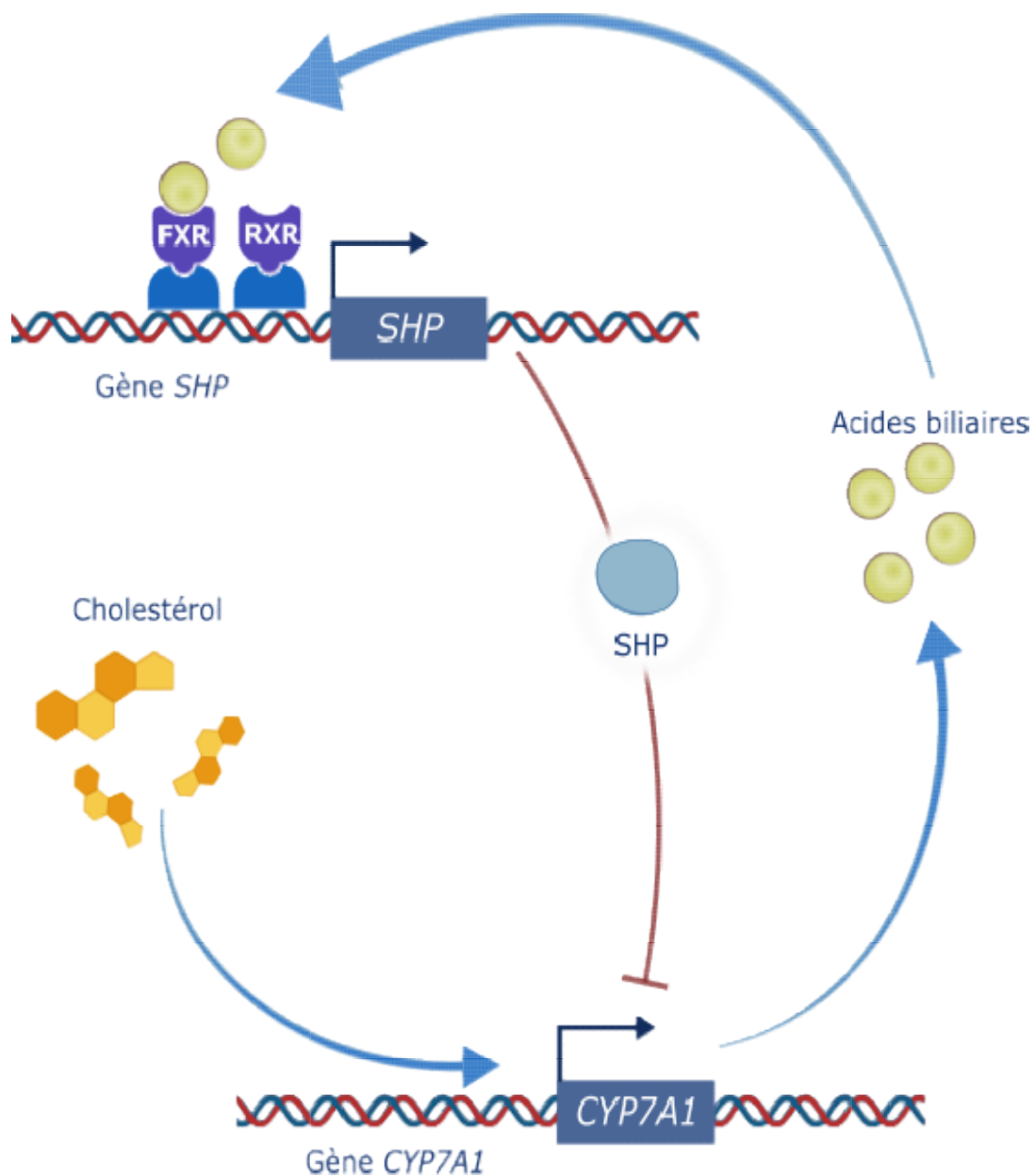


Figure 19 | Régulation transcriptionnelle, FXR dépendante du gène *CYP7A1* (Fang, 2017).

Lors de l'activation de FXR par les acides biliaires, FXR s'associe au RXR, l'hétérodimère induit l'expression génique du SHP, qui réprime l'expression génique du *CYP7A1* et réduit donc le taux de synthèse des acides biliaires hépatiques par le feedback négatif.

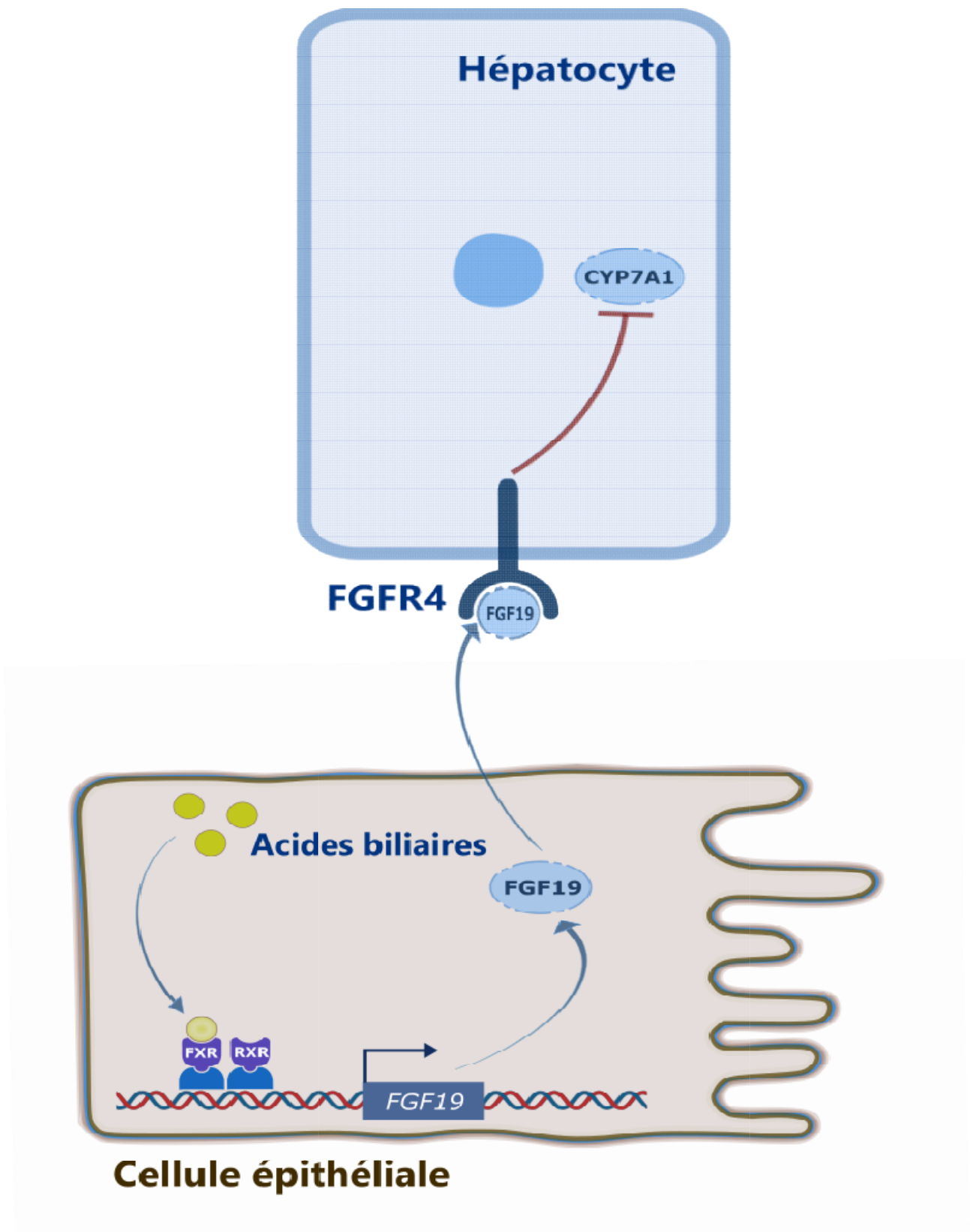


Figure 20 | Régulation de l'expression du gène *CYP7A1* par l'activation intestinale du FXR.

La sécrétion d'acides biliaires dans l'intestin active le FXR, conduisant à l'induction du facteur FGF15 / 19. Les protéines FGF15 / 19 élevées vont retourner vers le foie par la veine porte pour se lier au récepteur FGFR4 des hépatocytes. A ce moment-là, la voie de kinase c-Jun NH (2) -terminale (JNK) est activée, en conséquent, le gène *CYP7A1* est réprimé.

Comme le PXR, le VDR activé par le LCA, peut interagir avec HNF4 α et bloque le recrutement de PGC-1 α , mais il est aussi capable de recruter des corépresseurs du *CYP7A1* (Gupta et al., 2001).

Par ailleurs, il a été rapporté que les cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-1 β) sont capables d'inhiber la transcription du gène *CYP7A1* (Li et al., 2006a; Miyake et al., 2000). En effet, au cours de la réponse de la phase aiguë, les macrophages hépatiques (cellules de Kupffer) sont activés suite au signal TLR-4 qui a interagit avec le lipopolysaccharide ou également suite à l'induction par les acides biliaires (Chiang, 2013b; Li et al., 2006a; Miyake et al., 2000), ces cellules libèrent le TNF- α et IL-1 β . Ces derniers peuvent activer le récepteur TNF et la voie MAPK / JNK (Miyake et al., 2000). Le JNK phosphoryle cJun et HNF4 α et entraîne l'inhibition du *CYP7A1* (Gupta et al., 2001; Li et al., 2006b). De plus, les cellules de Kupffer activent les cellules stellaires hépatiques (HSC) qui sécrètent le TGF β -1 (transforming growth factor beta 1). Cette cytokine avec les acides biliaires activent la voie Ras / MAPK / JNK, induisent les dérivés réactifs oxydatifs (ROS) et phosphorylent le suppresseur de tumeur p53 (Cordenonsi et al., 2007; Wilkinson et al., 2005). Il a été rapporté que p53 interagit avec HNF4 α et inhibe son activation et peut entraîner une inhibition du *CYP7A1* (Maeda et al., 2002).

En plus, la sécrétion de TGF β -1 induit dans les hépatocytes la voie de signalisation SMAD. Les SMADs est une famille de protéines structurellement similaires qui sont les principaux transducteurs de signaux pour les récepteurs de la superfamille du TGF β . SMAD3 entre dans le noyau et recrute des histones désacétylases (HDACs) et le répresseur transcriptionnel SIN3A (paired amphipathic helix protein Sin3a) pour inhiber HNF4 α et en conséquent la transcription du *CYP7A1* sera réprimée (Li and Chiang, 2007; Myung et al., 2007).

Par ailleurs, une avancée majeure dans notre compréhension de la biologie des acides biliaires est intervenue ces dernières années en découvrant que les acides biliaires assurent leur effet répresseur en recrutant des enzymes de remodelage de la chromatine (De Fabiani et al., 2010), ainsi le voile est tiré sur le mécanisme d'action des acides biliaires dans la répression du *CYP7A1*. En effet, les acides biliaires sont capables de recruter plusieurs HDACs, d'abord HDAC3 et HDAC7 puis ultérieurement HDAC1 (De Fabiani et al., 2010; Mitro et al., 2007). En outre, la SHP interagit avec ces HDACs et la G9a méthyltransférase, qui désacétylent et méthyle, respectivement, les résidus arginine des protéines histones (Boulas and Talianidis, 2004; Fang et al., 2007). La SHP favorise également le recrutement du complexe Swi / Snf-Brm qui entraîne le remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP, qui réprime davantage la transcription du *CYP7A1* (Fang et al., 2007; Kemper et al., 2004) (figure 22).

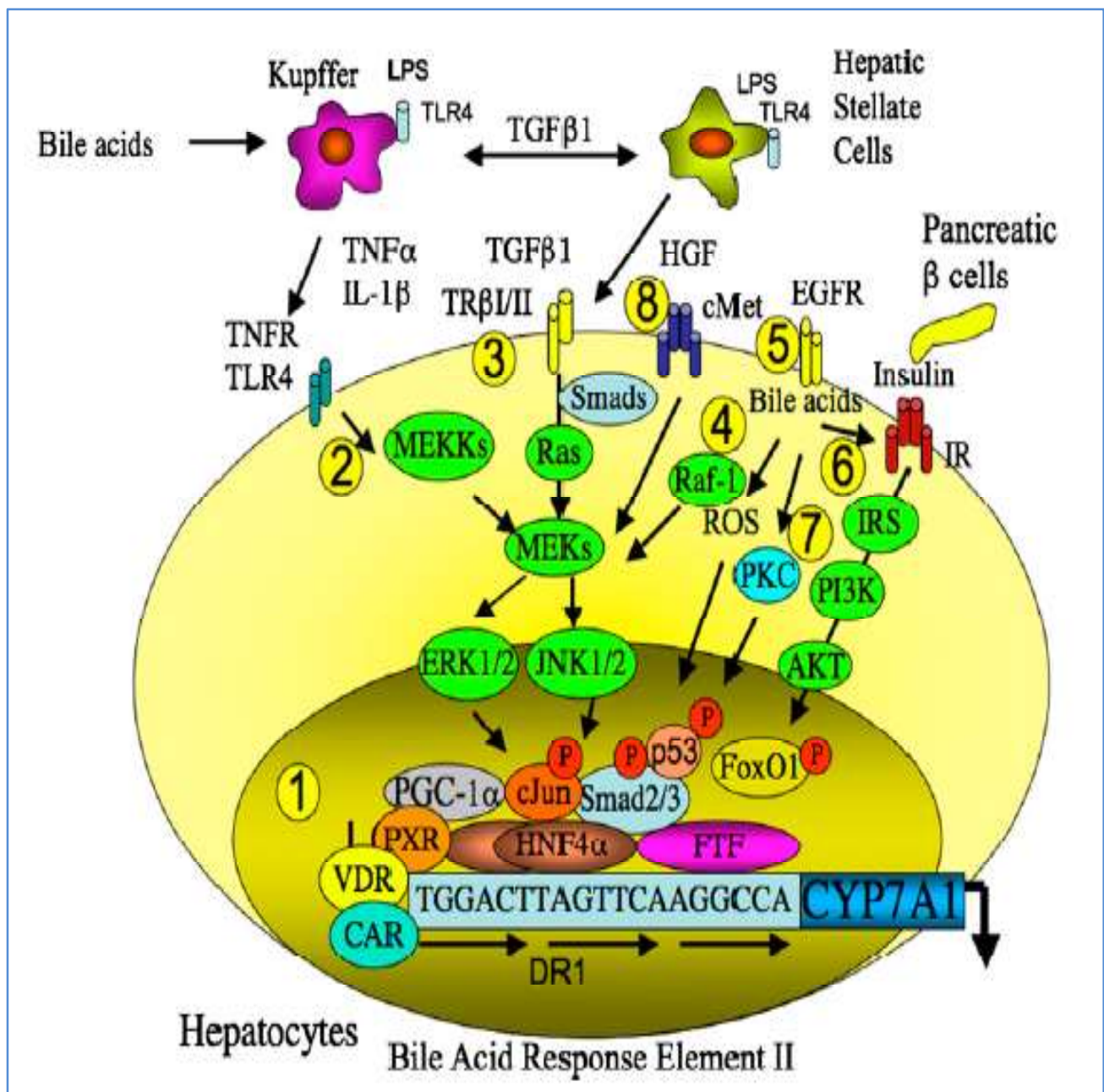


Figure 21 | Régulation de la transcription du *CYP7A1* par différentes voies de signalisation indépendante du FXR (Chiang, 2009; Li and Chiang, 2014a)

(1) LCA active le PXR, le VDR et le CAR (indirectement), qui inhibent la transcription du *CYP7A1* en interagissant avec HNF4 et en lui empêchant d'activer le co-activateur PGC-1. (2) Dans les cellules de Kupffer, les acides biliaires stimulent la sécrétion des cytokines inflammatoires TNF-α et IL-1β, qui activent le récepteur du TNF et les voies MAPK / JNK pour inhiber la transcription du *CYP7A1*. (3) TGFβ1 sécrétée par les cellules HSC active le récepteur TGF1 et la voie MAPK / Smad. Smad3 interagit avec HNF4 et recrute des HDACs et SIN3A pour inhiber la transcription du *CYP7A1*. (4) Les acides biliaires et TGFβ1 induisent des espèces oxydantes réactives (ROS) et activent la p53, qui interagit avec HNF4 et inhibe l'expression du *CYP7A1*. (5) Les acides biliaires activent également le récepteur EGFR (epidermal growth factor receptor) et la voie de signalisation Raf-1 / MEK / ERK pour inhiber le *CYP7A1*. (6) Les acides biliaires améliorent la signalisation du récepteur de l'insuline en phosphorylant et activent le substrat du récepteur de l'insuline, PI3K et AKT, qui phosphorylent FoxO1 et inhibent le *CYP7A1*. (7) Les acides biliaires activent également la protéine kinase C, qui phosphoryle cJun pour inhiber le *CYP7A1*. (8) Au cours des lésions hépatiques et de la régénération, le HGF (hepatocyte growth factor) sécrété par les cellules HSC, active le cMet (récepteur du HGF) et les voies MAPK pour inhiber le *CYP7A1*.

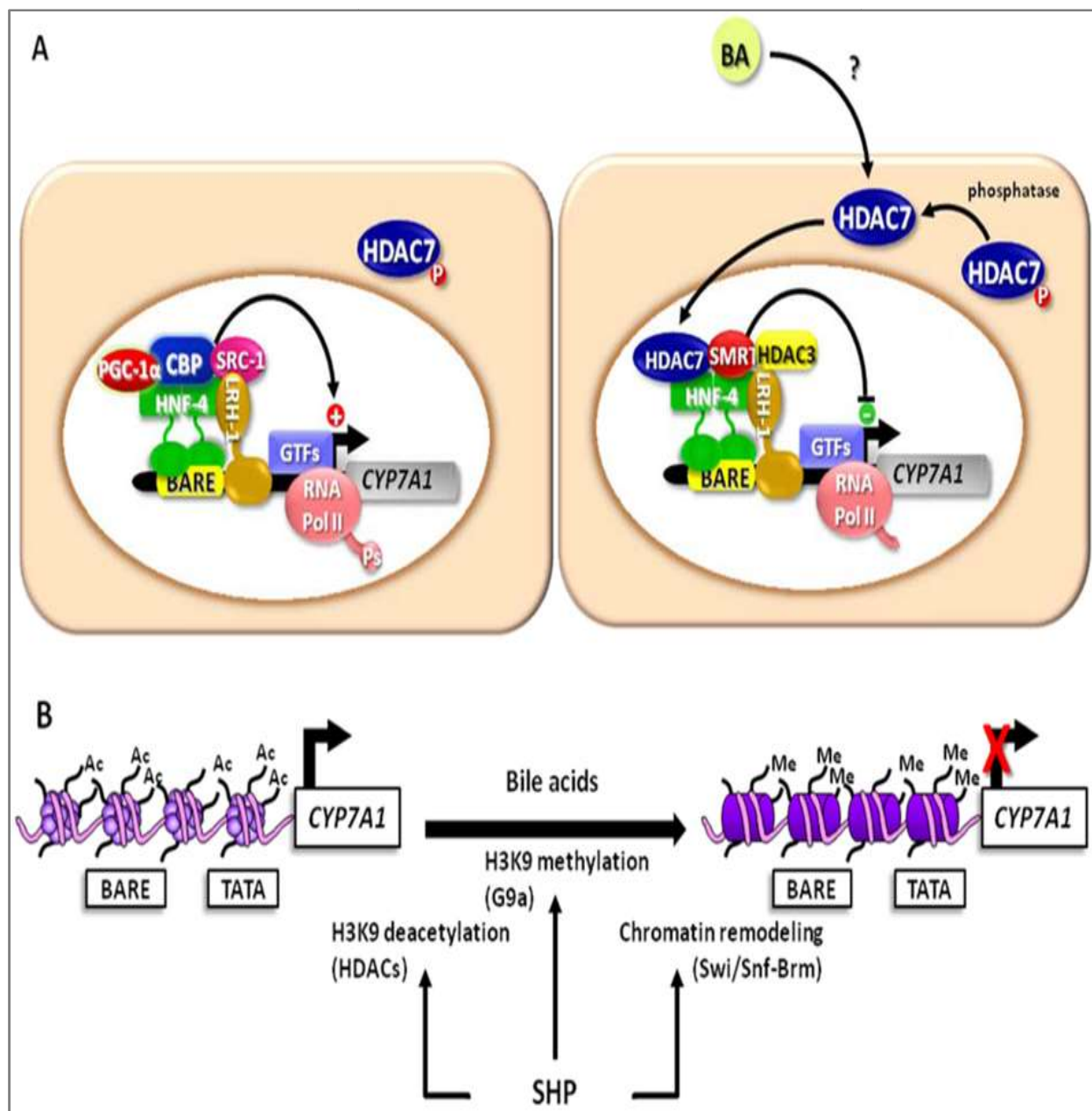


Figure 22 | Schéma décrivant le rôle des enzymes de remodelage de la chromatine dans la régulation transcriptionnelle de *CYP7A1* (De Fabiani et al., 2010).

(A). En absence des acides biliaires dans les hépatocytes, un complexe transcriptionnel actif est assemblé au niveau des régions BARE. En plus de facteurs rapportés à la figure 19, d'autres protéines contribuent à la transactivation, notamment le LRH-1 et coactivateur du récepteur des stéroïdes (SRC) -1. ARN polymérase II est phosphorylée et devient plus active. HDAC7 est séquestré dans le cytoplasme. Dans ces conditions, les résidus d'arginine des histones, en particulier de l'histone H3, sont acétylés (B). En présence d'acides biliars, HDAC7 effectue dans une première phase une translocation vers le noyau et s'associe au promoteur du *CYP7A1* (A). Le recrutement d'autres facteurs, HDAC3 et le médiateur de silence pour les récepteurs des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes (SMRT), contribue à la formation d'un complexe répressif. D'autre part, les acides biliars induisent la synthèse de la SHP qui agit comme un répresseur. De plus, la SHP interagit avec HDACs et G9a méthyltransférase, qui désacétyle et méthyle, respectivement, résidus d'arginine de protéines histones (B). SHP induit également le recrutement du complexe Swi / Snf-Brm qui entraîne le remodelage de la chromatine ATP-dépendante, ce qui réprime la transcription du *CYP7A1* (B).

I.6.2 Associations des polymorphismes de *CYP7A1* à plusieurs maladies

En raison du rôle du CYP7A1 en tant qu'élément clé de la conversion du cholestérol, les polymorphismes du gène *CYP7A1* ont été examinés pour déterminer leurs effets potentiels sur le métabolisme des lipides. Il a été montré que des variants génétiques du *CYP7A1* influençaient les taux sériques de lipoprotéines LDL et la concentration des triglycérides (Couture et al., 1999; Pullinger et al., 2002; Wang et al., 1998; Ková et al., 2004). Une grande majorité de ces études concernaient le variant rs3808607 SNP (−204A/C), qui est localisé dans la région promotrice du gène *CYP7A1*. Ainsi, des associations ont été rapportées entre les polymorphismes du gène *CYP7A1* et des maladies telles que les calculs biliaire (Cai et al., 2014; Jiang et al., 2004), cancer de la vésicule biliaire (Srivastava et al., 2010, 2008), cancer du côlon proximal (Hagiwara et al., 2005a; Ito et al., 2010; Tabata et al., 2006; Wertheim et al., 2012), neuromyéélite optique (Kim et al., 2010), maladies de l'artère coronaire (Hofman et al., 2005; Iwanicki et al., 2015; Lambrinoudaki et al., 2008; Pullinger et al., 2002).

I.6.3 Structure et localisation de la protéine CYP7A1

La cholestérol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) (EC1.14.13.17) est une cytochrome P450 monooxygénase (Myant and Mitropoulos, 1977; Noshiro and Okuda, 1990). Les enzymes CYPs sont un membre d'une superfamille multigénique de protéines enzymatiques dites « hémithiolates » (de type 1) (Klingenberg, 1958; Omura and Sato, 1964, 1962; Smith et al., 2015), qui effectuent l'oxydation, les transformations métaboliques peroxydantes et réductrices de nombreuses substances endogène (hormones stéroïdiennes, cholestérol, acides gras) et la biotransformation des xénobiotiques (médicaments, pesticides, polluants) (Guengrich, 2005). En ce qui concerne la diversité des substrats qui sont métabolisés, les enzymes CYPs sont considérées comme les catalyseurs biologiques les plus polyvalents (Guengrich, 2005; Testa and Krämer, 2007). Les réactions de monooxygénase (équation ci-dessous) catalysées par les CYPs sont exécutées avec une précision remarquable (Smith et al., 2015).



Afin de les rendre fonctionnels, les CYPs ont également besoin d'une source d'électrons. Ces électrons sont apportés par une autre protéine: la NADP cytochrome P450 réductase, si le cytochrome P450 est situé dans le réticulum endoplasmique, la ferredoxine si le cytochrome P450 est situé dans les mitochondries. Le NADPH est la source majeure d'électrons dans ce système (figure 23) (Porter and Coon, 1991; Smith et al., 2015).

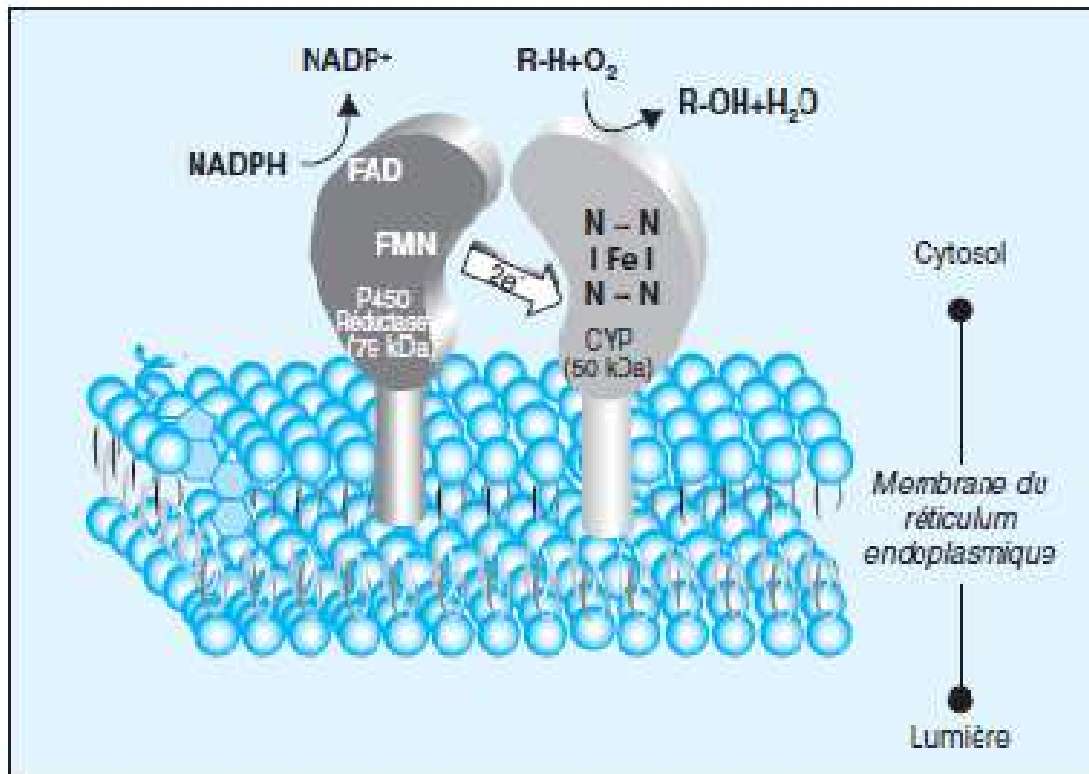


Figure 23 | Localisation membranaire de cytochromes P450 dans le réticulum endoplasmique (Guéguen et al., 2006).

La transformation d'un composé chimique par les enzymes à cytochromes P450 a lieu sur la face externe du réticulum endoplasmique où est ancrée l'enzyme. Le site actif du cytochrome P450 contient un atome de fer (Fe) fixé par des liaisons de coordinances. Deux électrons, provenant d'une molécule de NADPH, sont transférés à l'hémoprotéine par une flavoprotéine (FAD-FMN) en présence d'une molécule organique (R-H) et d'un atome d'oxygène. Le composé organique est oxydé et un atome d'oxygène moléculaire est incorporé au produit chimique (R-OH). R: médicaments, acides gras, stéroïdes, polluants.

A l'exception de certains microorganismes primitifs, les CYPs se trouvent dans presque tous les organismes vivants tels que les bactéries, levures, plantes et animaux. Ils sont ubiquitaires dans l'organisme, mais particulièrement abondants au niveau du foie et plus précisément localisés dans les membranes du réticulum endoplasmique (RE) des hépatocytes (Reed and Backes, 2017).

Effectivement, la CYP7A1 est une enzyme de la membrane du réticulum endoplasmique des hépatocytes, d'un poids moléculaire de 57,63 Da et contient 504 acides aminés (Noshiro and Okuda, 1990b). C'est un cytochrome P450 typique avec le noyau structural conservé des hélices D, E, I et L autour du groupe prothétique de l'hème (figure 24). La CYP7A1 nécessite un cytochrome P450 réductase en tant que donneur d'électrons. L'analyse structurale et conformationnelle du CYP7A1 révèle qu'elle a un résidu Asn (asparagine) au lieu du Thr (threonine) conservé chez la plupart des CYPs. En outre, au niveau de l'hélice B', les résidus Thr104 et Ser105, jouent un rôle crucial dans la reconnaissance de substrat. L'hélice B' est connue pour contrôler la spécificité du substrat (Williams et al., 2000). De plus, le positionnement du site catalytique du substrat est contrôlé par le résidu W284. Un résidu nécessaire pour assurer le bon positionnement du substrat stéroïdien à côté de l'hème (Mast et al., 2005).

I.6.4 Rôle physiologique de CYP7A1

La CYP7A1 catalyse la première étape de la transformation du cholestérol hépatique en acides biliaires; c'est l'enzyme clé du catabolisme du cholestérol (figure 25) (Schwarz et al., 1998). En effet, il a été rapporté qu'une mutation (1302-1303delTT) peut entraîner une perte de fonction de la protéine ayant une conséquence dramatique sur l'homéostasie du cholestérol avec des taux plasmatiques élevés de cholestérol, de LDL, et de triglycérides chez les sujets homozygotes (Pullinger et al., 2002). Contrairement, la surexpression du CYP7A1 chez des souris transgéniques (CYP7A1-tg) leur a permis de résister à l'obésité, à la stéatose hépatique et au diabète induits par un régime alimentaire riche en graisses (Qi et al., 2015).

Chez l'homme, la voie classique est considérée comme la principale voie de biosynthèse des acides biliaires puisqu'elle produit 90% de la totalité des acides biliaires formés. Comme déjà cité, la voie classique est initiée par une cholestérol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) microsomique, qui convertit le cholestérol en 7 α -hydroxycholestérol et constitue l'étape limitante de la voie classique (Myant and Mitropoulos, 1977). Ensuite, la 3 β -hydroxy- Δ 5-C27-stéroïde déshydroxylase (3 β -HSD, HSD3B7) convertit le 7 α -hydroxycholestérol en 7 α -hydroxy-4-cholestène-3-one (C4), qui est le précurseur commun des acides choliques (AC) et des acides chenodeoxycholiques (ACDC) (Axelson et al., 1988; Honda et al., 2007; Li and Chiang, 2014b) en faisant intervenir deux enzymes: la 12 α -hydroxylase microsomale (CYP8B1) et la stérol 27-hydroxylase mitochondriale (CYP27A1) (figure 25).

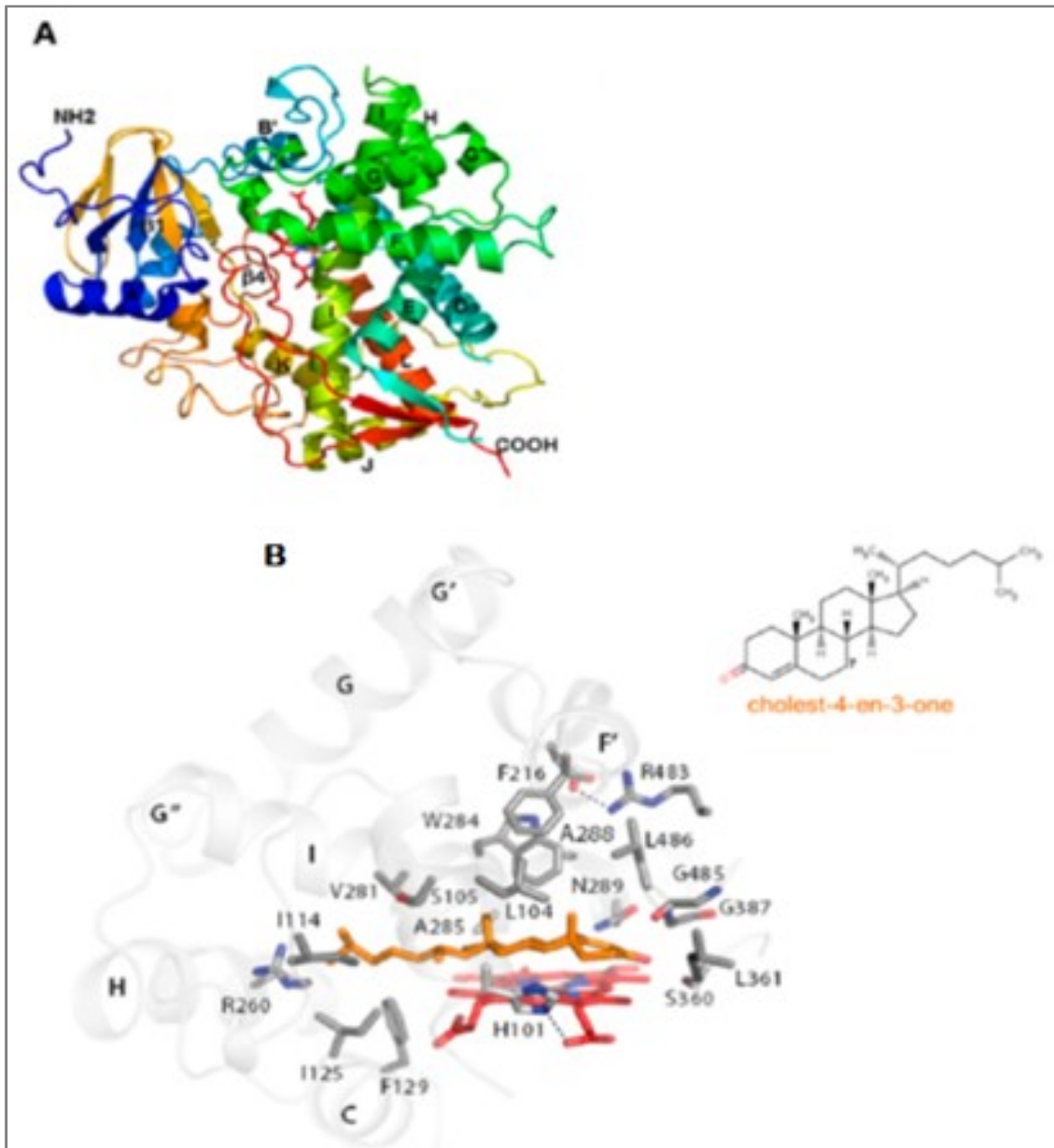


Figure 24 | Structure de l'enzyme CYP7A1 (Tempel et al., 2014)

(A) Structure générale du CYP7A1, du N-terminal (bleu) au C-terminal (rouge). (B) CYP7A1 lié à la cholest-4-en-3-one. Cholest-4-en-3-one (orange) est entouré de 16 résidus dans un rayon de 4 Å provenant de différents éléments structuraux : l'hélice B' (H101, T104L, S105), boucle BC (I114), hélice C (I125 et F129), hélice H (R260), hélice I (V281, W284, A285 et N289), la boucle entre l'hélice K et 1 à 4 brins (S360 et L361) et la boucle entre deux 4 brins à l'extrémité C (G485, L486 et G487).

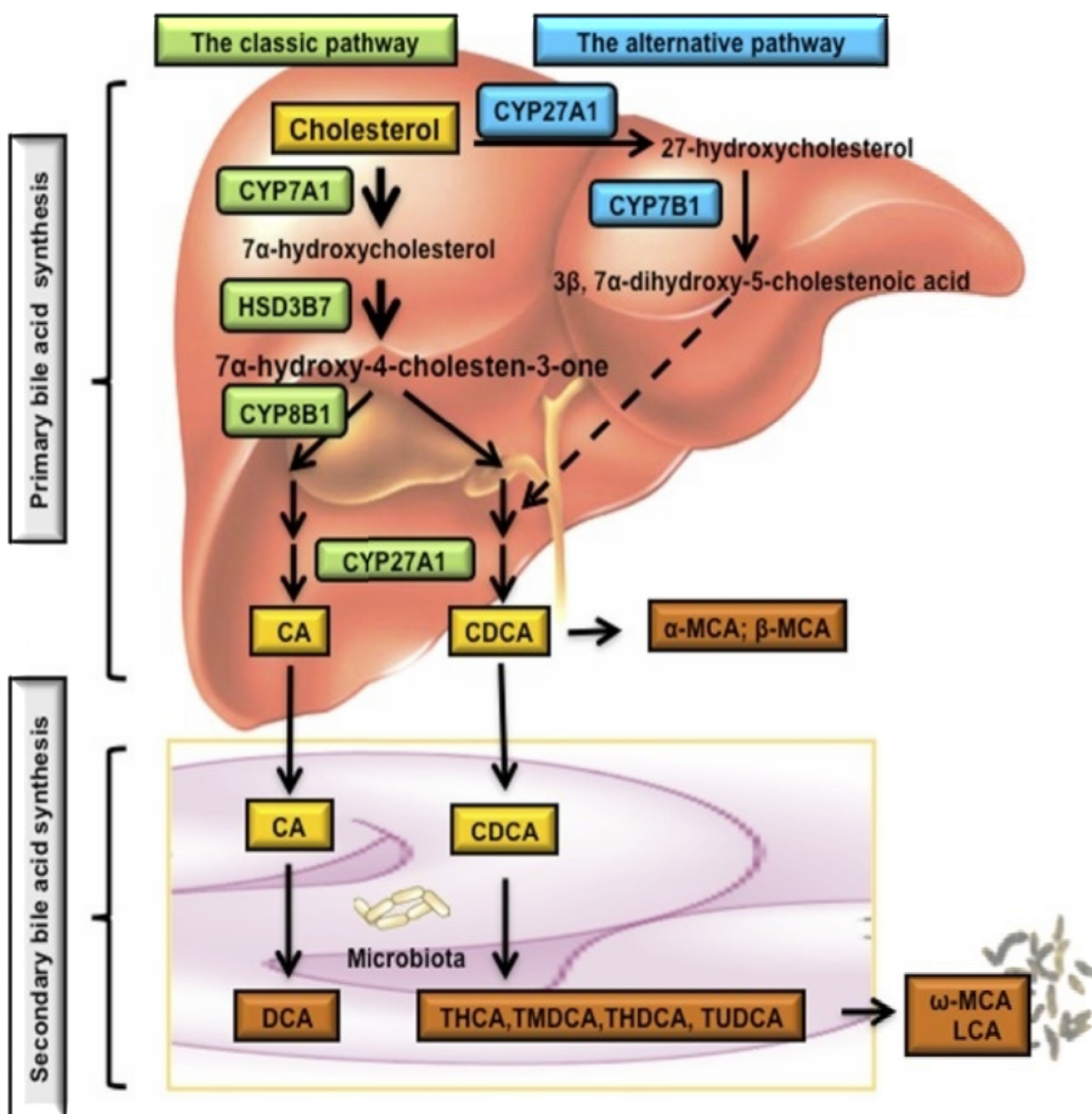


Figure 25 | Les voies de biosynthèse des acides biliaires (Li and Chiang, 2014a).

Deux principales voies de biosynthèse des acides biliaires sont présentées. Dans la voie classique, le cholestérol est converti en 7α-hydroxycholestérol par l'enzyme limitant le débit, CYP7A1, située dans le RE. La 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase (3βHSD, HSD3B7) convertit le 7α-hydroxycholestérol en 7α-hydroxy-4-cholestène-3-one (C4), qui est convertie en 7α, 12α-dihydroxy-4-cholestène-3-one par un stérol 12α-hydroxylase (CYP8B1) conduisant à la synthèse de CA. Sans la 12α-hydroxylation par le CYP8B1, le C4 est finalement converti en CDCA. La 27-hydroxylase de stérol mitochondrial (CYP27A1) catalyse l'oxydation de la chaîne latérale du stéroïde lors de la synthèse de CA et de CDCA. Dans la voie alternative, le cholestérol est d'abord converti en 27-hydroxycholestérol par le CYP27A1. L'oxystérol 7α-hydroxylase (CYP7B1) catalyse l'hydroxylation du 27-hydroxycholestérol en acide 3β, 7α-dihydroxy-5-cholesténoïque, qui est finalement converti en CDCA. L'oxystérol 7α-hydroxylase (CYP7B1) est non spécifique et peut également catalyser l'hydroxylation du 25-hydroxycholestérol en 5-cholestène-3β, 7α, 25-triol. Dans l'intestin, l'activité bactérienne de la 7α-déshydroxylase converse respectivement avec CA et CDCA en DCA et LCA. Le CYP3A1 et l'épimérase convertissent également CDCA en acides biliaires secondaires, notamment les acides THCA, TMDCA, MC-MCA, THDCA et TUDCA. Le LCA et le ω-MCA sont excrétés dans les fèces. THCA, acide taurohyocholique; THDCA, acide taurohyodésoxycholique; TMDCA, acide tauromurideoxycholique.

Outre la voie principale ou voie neutre, il existe une voie alternative permettant aussi la conversion du cholestérol, d'abord en 27-hydroxycholestérol par le CYP27A1. La CYP7B1 (oxystérol 7 α -hydroxylase) catalyse l'hydroxylation du 27-hydroxycholestérol en acide 3 β , 7 α -dihydroxy-5-cholesténoïque, qui est finalement converti en CDCA.

I.7 Objectifs

L'identification de la 8q12-13 comme une région chromosomique fortement associée à la TB dans la population marocaine est un résultat fort-intéressant. C'est pour cette raison que l'exploration génétique de cette région est d'un intérêt majeur pour identifier le ou les variants génétiques impliqués dans le contrôle de la sensibilité ou la résistance à la TB.

Ainsi, par la présente thèse, nous avons visé d'atteindre les objectifs suivants:

— Objectif général

Contribuer à l'étude et à la recherche des facteurs génétiques de prédisposition à la TB localisés dans la région 8q12-13.

— Objectifs spécifiques

Pour atteindre notre objectif général, quatre études ont été menées:

- 1- Etudier l'association des variants génétiques des gènes *CYP7A1* et *NSMAF* avec le développement de la TB.
- 2- Analyser les haplotypes des mutations sélectionnées.
- 3- Valider les résultats obtenus par PCR-RFLP par la technique du séquençage.
- 4- Evaluer l'impact des faibles concentrations en vitamine A sur le risque de développer la TB.

Pour réaliser ceci, nous avons sélectionnés deux gènes candidats potentiels (*NSMAF* et *CYP7A1*) sur la base, d'une part de leur localisation chromosomique (entre les microsatellites D8S2332 et D8S1763 situées dans la région 8q12.1) et d'autre part en raison de leurs rôles dans les mécanismes de défense immunitaire de l'hôte. L'approche d'investigation proposée a reposé sur l'étude de polymorphismes de type SNPs (single nucleotide polymorphisms) (objectifs 1 et 2). Par ailleurs, pour valider les résultats du génotypage obtenus par PCR-RFLP, nous avons choisi comme technique, le séquençage (objectif 3). Enfin, pour accomplir l'objectif 4, nous avons opté pour une quantification plasmatique du rétinol par HPLC.

II Matériels et méthodes

II.1 Type d'étude

Pour atteindre nos objectifs et réaliser les investigations nécessaires, nous avons utilisé le modèle statistique d'étude cas-témoin afin de comparer entre des sujets "malades" (patients tuberculeux) et des sujets sains "contrôles cliniquement sains" non apparentés.

Ces travaux de recherche, qui rentre dans le cadre du projet IMMGEN, ont été approuvés par le comité d'éthique de la Faculté de Médecine et Pharmacie de l'Université Mohammed V de Rabat (Numéro de référence 1169).

II.2 Population de l'étude

II.2.1 Echantillonnage et lieux de recrutement

Ces travaux de recherches ont été menés sur 403 participants, adultes, consentants, recrutés dans 19 centres de santé impliqués dans le projet IMMGEN. L'échantillonnage a été réalisé entre janvier 2010 et décembre 2012.

- Le groupe de patients comprenait des patients avec TB pulmonaires et d'autres avec TB pleurale, volontaires, recrutés dans les hôpitaux préfectoraux (Fès, Marrakech, Casablanca, Oujda et Tanger), deux centres hospitaliers de Casablanca et Rabat et les Centres de Diagnostic et de Traitement de tuberculose et des Maladies Respiratoires (CDTMR) des villes de Rabat, Casablanca, Salé, Temara, Fès, Marrakech, Tanger, Oujda, Meknes et Sidi Kacem, où l'examen clinique, la radiographie thoracique, la bascilloscopie, la culture des crachats et l'analyse anatomopathologique (cas de TB pleurale) ont été réalisés.
- Le groupe des contrôles sains comprenait des donneurs de sang volontaires, consentants, non apparentés. Leur recrutement a été effectué dans centres régionaux de transfusion sanguine (CRTS) de cinq différentes régions du Maroc (Oujda, Fès, Tanger, Rabat et Marrakech). Une intradermoréaction (IDR), ainsi qu'un interrogatoire et un examen clinique complet sont réalisés par les médecins des CRTS pour s'assurer que les contrôles ne présentaient aucun symptôme ou antécédents de TB et qu'ils sont restés dans cet état immunologique pendant les deux années qui ont suivi leur recrutement.

Tous les sujets ont signé un consentement éclairé (annexe I) et étaient négatifs pour l'infection à VIH-1/2 (testé par AxSYM Assays, Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA).

Toutes les données démographiques et cliniques sur les patients et les contrôles ont été remplies dans des questionnaires (annexe II et III).

II.2.2 Prélèvements

Un prélèvement sanguin d'environ 10 ml leur a été fait, sur tube EDTA. Les échantillons sanguins sont couverts de papier aluminium pour les protéger de la lumière et sont acheminés directement à l'Institut National d'Hygiène dans des sacs isothermes avec accumulateur de froid. Les prélèvements ont été centrifugés et le plasma a été séparé, fractionné et stocké à -80 °C, jusqu'à la réalisation d'une sérologie VIH et de l'extraction de la vitamine A. Le reste des prélèvements a été utilisé pour une extraction d'ADN génomique sur sang frais. Les éluats d'ADN ont été stockés à -80 °C jusqu'à l'analyse.

II.2.3 Critères d'inclusion

- Groupe de patients: Sont admis à l'étude tous les patients âgés de 18 ans et plus, quelque soit leur sexe, présentant une TB pulmonaire prouvée (microscopie + et culture +) et les patients avec TB pleurale confirmée (histologie +).
- Groupe de contrôles sains: Agés de 18 ans et plus, sans symptômes ou antécédents de TB, volontaires et consentants. Non apparentés aux malades et dont l'IDR s'est révélé négative (diamètre <5 mm) et ils sont restés dans cet état immunologique pendant les deux années qui ont suivi leur recrutement. Ce suivi a été assuré par les équipes médicales des CRTS.

II.2.4 Critères d'exclusion

- Groupe de patients: Ne seront pas admis :
 - Les patients avec autres formes de la TB extra-pulmonaire que la forme pleurale.
 - Les patients ayant une maladie chronique et/ou un traitement pouvant altérer les moyens de défense (corticoïdes au long cours, diabète insulino-dépendant, traitement aux immunosuppresseurs, VIH positif).
- Groupe de contrôles :
 - Les contrôles ayant une IDR positive ou développant une TB durant les 2 ans qui suivaient leur recrutement.

II.2.5 Caractéristiques cliniques et démographiques de la population d'étude

Les caractéristiques démographiques et épidémiologiques sont résumées dans le tableau 3. L'analyse de ces données a montré que le sex-ratio (hommes /femmes) chez les patients tuberculeux était presque similaire à celui du groupe contrôles (2 contre 1,7 respectivement).

L'état clinique était disponible pour tous les patients tuberculeux: 100 % étaient des nouveaux cas dont 78 % (172/222) avaient une TB pulmonaire et 22 % (50/222) avaient une TB pleurale.

Tableau 3: Caractéristiques démographiques et cliniques de la population étudiée

Variables	Patients TB (N=222)	Contrôles sains (N=181)
Age (Moyenne $\pm$ SD)	35,2 $\pm$ 11,6	35,5 $\pm$ 11,06
Sexe, [n (%)]		
Hommes	153 (69)	122 (67)
Femmes	69 (31)	59 (33)
Statut VIH	Négatif	Négatif
Caractéristiques cliniques, effectif (%)		
Toux	217 (98)	Absence de symptômes
Fièvre	194 (87)	
Expectoration	173 (78)	
Hémoptysie	71 (32)	
Amaigrissement	209 (94)	
Lésions radiologiques	222 (100)	

II.3 Méthodologie

II.3.1 Choix de gènes candidats

Nous avons eu recours aux bases de données GenBank (NCBI-NIH) et Ensembl (EBI, WSI) pour lister en premier lieu, tous les gènes localisés dans la région chromosomique d'intérêt, la 8q12-13. Cette région est localisée entre les marqueurs D8S2332 et D8S1763, elle correspond à 4 Mb d'ADN chromosomique. L'analyse bibliographique des gènes localisés à cette région chromosomique, a souligné leur importance dans la réponse immunitaire. En se basant sur ceci, deux gènes candidats potentiels ont été retenus: *CYP7A1* et *NSMAF*.

II.3.2 Choix des mutations ponctuelles (SNP)

Les régions d'intérêt des gènes ont été analysées en utilisant plusieurs outils bioinformatiques, notamment la "dbSNP" et "1000 Genomes" du projet HapMap (NIH, www.hapmap.ncbi.nlm.nih.gov) et le logiciel SNPbrowser™ v 4.0 (Applied Biosystems). La sélection des SNPs candidats est faite en prenant en considération la position de la mutation par

rapport au gène et la fréquence de l'allèle mineur (MAF) dans différentes populations. Les SNPs retenus ont été confrontés aux données rapportées dans la littérature (PubMed) pour évaluer leurs pertinences. Ainsi, six variants génétiques ont été sélectionnés;

Pour le gène *NSMAF*: Trois SNPs.

- Le premier, c'est le rs36067275 C> T, une mutation faux-sens provoquant une substitution de l'acide glutamique par la lysine en 487.
- Le second SNP, rs2228505 T> C, est une mutation faux-sens provoquant une substitution de la tyrosine par la cystéine en position 626.
- Le troisième est située dans la 3'UTR (région non traduite) représenté par rs1050504 C> T.

Par ailleurs trois SNPs ont été sélectionnés au niveau du gène *CYP7A1*.

- Le premier SNP rs8192875 C> T est situé dans le quatrième exon et représente une mutation non-sens.
- Le second SNP rs8192879 C> T se situe dans la région 3'UTR.
- Le troisième SNP rs3808607 A> C est situé dans la région promotrice.

II.3.3 Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique total a été extrait du sang périphérique de tous les patients tuberculeux et contrôles sains en utilisant la trousse QIAamp® DNA Blood Maxi (QiagenGmbH, Hilden, Allemagne) (annexe IV).

II.3.4 Dosage et contrôle de la qualité de l'ADN

Tous les éluats d'ADN extrait ont été dosés sur NanoDrop™ 2000 (Thermo FisherScientific, Waltham, MA, USA) pour déterminer leurs concentrations et vérifier leurs qualités.

II.3.5 Génotypage par PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism)

La technique est utilisée pour génotyper le SNP rs3808607 A/C du gène *CYP7A1*. Une substitution de A par C dans la position - 204 du codon d'initiation de la transcription crée un site de restriction Bsa I (5' GGTCTC 3'). Pour génotyper cette mutation, la région du promoteur du gène *CYP7A1* contenant le SNP (rs3808607 A/C) est amplifiée. L'amplification est réalisée en utilisant les amorces suivantes: 5'-AAGTTTTTCCCAGTTCTCTTTC-3' (sense) et 5'

AATTAGCCATTGTTCATTCTATTAG-3'

(antisense)

(eurofinsmwg/opro:

oligonucleotidesynthesis: 2467472).

La réaction de PCR a été réalisée en ajoutant 1 µl d'ADN (50-150 ng/µl) à laquelle sont ajoutés 2,5 µl de MgCl₂, 5 µl du tampon, 0,5 µl de dNTP, 1,5 µl de chacun des amorces et 0,5 µl de Taq polymérase. L'amplification a été réalisée en demarrant par une dénaturation initiale à 94 ° C pendant 4 minutes, puis 30 cycles de PCR ont été effectués à 94 ° C pendant 30 s, 53 ° C pendant 30 s et 72 ° C pendant 30 s , avec une extension finale à 72 ° C pendant 7 minutes. Par la suite, les produits PCR ont été digérés en ajoutant 1 µl de BSA, 2 µl de tampon NEBuffer (tampon d'enzyme), 0,5 µl de l'enzyme Bsa I, 10 µl de produit PCR et l'eau qualité biologie moléculaire (Bio Mol) (DNase/RNase free) pour un volume réactionnel de 20 µl. La digestion enzymatique s'est déroulée à 37 ° C pendant une nuit, suivie d'une électrophorèse sur un gel d'agarose 2% (Hagiwara et al., 2005b).

II.3.6 Génotypage par hydrolyse de sondes fluorescentes TaqMan® MGB

La technique est utilisée pour génotyper cinq mutations; deux SNP du gène *CYP7A1*: le rs8192875 C> T et le rs8192879 C> T; et trois SNP du gène *NSMAF*: le rs36067275 C>T, le rs2228505 T > C et le rs1050504 C > T. Le génotypage des SNPs sélectionnés ont été effectuées comme recommandé par le fabricant (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) pour un volume final de 20 µl (annexe V). Les échantillons d'ADN ont été préparés en diluant chaque échantillon avec de l'eau Bio Mol pour avoir une masse finale de 50 ng par puits. Le mélange réactionnel a été préparé en mettant 0,5 µl du SNP Genotyping Assay (40×) à 10 µl Taq Man Universal PCR Master Mix (2×), No AmpErase UNG ont été mélangé. Le tube contenant la réaction mix a été mélangé plusieurs fois par inversement du tube puis centrifugé brièvement pour éliminer les bulles d'air et faire descendre le produit. La plaque a été préparée en déposant 10,5 µl du mélange réactionnel par puits, 9,5 µl de chaque échantillon d'ADN dilué dans les puits correspondants et 9,5 µl de l'eau Bio Mol au niveau des puits des contrôles négatifs ce qui permet de contrôler la contamination lors de la manipulation. La plaque a été fermée par un film adhésif, puis centrifugée brièvement pour faire descendre la solution et pour éliminer les bulles d'air. Ensuite, la plaque a été placée dans l'automate de PCR en temps réel du système 7500 Fast Real-Time Système de PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), la position des puits a été programmée sur le logiciel puis les paramètres de la PCR ont été réglés selon les conditions suivantes :

- Pré-amplification (Activation de l'enzyme) 10 min à 95°C
- Dénaturation 15 sec à 92°C
- Hybridation/Extension 1 min à 60°C

} 40 cycles

L'analyse et l'interprétation des résultats de fluorescence se fait en point final avec le logiciel 7500 v 2.0.4 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Elle est basée sur la détection des deux fluorophores VIC et FAM. Ainsi la présence du VIC seul, indique une homozygotie pour l'allèle 1, alors que la détection du signal FAM seul, indique une homozygotie pour l'allèle 2, et quand on a les deux signaux VIC et FAM cela indique une hétérozygotie.

Pour assurer le contrôle de qualité de la réaction, 10 % des échantillons ont été génotypés deux fois.

II.3.7 Séquençage de la région promotrice du gène *CYP7A1* contenant le rs3808607

II.3.7.1 Amplification par PCR end-point

La PCR a été réalisée en préparant un mélange réactionnel contenant 5 µl de tampon d'enzyme (Bioline), 1 µl de chacun des amorces (10 µM) et 0,2 µl de Taq polymérase (TaqBioline, 5U/µl) dont 7,2 µl est déposé par tube PCR ; 1-3 µl d'ADN (100 ng/µl) PCR et l'eau Bio Mol pour compléter à un volume final de 25 µl. L'amplification a été réalisée selon le protocole suivant ; une dénaturation pendant 15 s à 95 °C, précédée d'une étape initiale d'activation d'enzyme pendant 1 min à 95 °C, puis hybridation 20s à 45 °C, et élongation 3 minutes à 72°C (pour 40 cycles). La PCR est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 %.

II.3.7.2 Purification de produits PCR

Pour réaliser la purification des produits PCR, nous avons utilisé le kit ExoSAP-IT (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Dans la plaque de réaction (MicroAmp optical 96, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 5 µl du produit de la réaction de PCR a été mélangé à 2 µl de l'ExoSAP-IT (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), pour un volume final de 7 µl. Ensuite, la plaque a été incubée en premier lieu à 37°C pendant 15 min pour dégrader les amorces et les nucléotides libres puis, à 80°C pendant 15 min, pour inactiver l'ExoSAP-IT (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA).

II.3.7.3 Réaction de séquence

Le mélange réactionnel a été préparé en ajoutant 4 µl Big Dye Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 4 µl Primer (0.8 pmol/µl), 0.75-1.5 µl d'AND, 1,2 µl 5X sequencing buffer, complété à 20 µl par 8.5 - 9.25 µl d'eau ultra pure. Ce mélange réactionnel a été ensuite transféré sur une plaque de réaction 96 puits (MicroAmp optical 96, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La réaction de séquence a été effectuée selon le protocole suivant:

Cycle	Temps	Température °C	
Dénaturation initiale	1 minute	96°C	
Dénaturation	10 secondes	96°C	x 25 cycles
Hybridation	5 secondes	50°C	
Elongation	4 minutes	60°C	

II.3.7.4 Purification de la réaction de séquence

Cette procédure s'est déroulée comme suit: 300µL de Sephadex G50 superfine (SIGMA Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a été déposé dans une microplaque à fond filtrant de 0.45 µm (plaque Multiscreen MSHAN45) adaptée sur une plaque de récupération. Par la suite la plaque a été centrifugée à 1500g pendant 3 min. Ces deux dernières étapes ont été répétées deux fois. Puis 20µL d'eau Bio Mol a été ajouté sur 30 µL des produits de la réaction de séquence récupérés. Une plaque ABI (MicroAmp, Applied Biosystems) a été utilisée comme plaque de récupération. Une dernière centrifugation a été réalisée à 1100g pendant 5min. et enfin, la plaque ABI a été placée dans le Séquenceur ABI 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Les données brutes ont été analysées par le logiciel Sequence Scanner 2.0 (Applied Biosystems). Les résultats ont été ensuite analysés par le logiciel DNA Baser Assembler v 5.15 (Heracle BioSoft, <http://www.DnaBaser.com>), puis alignés par rapport à la séquence de référence sur la base de données NCBI via l'algorithme BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

II.3.8 Extraction du rétinol et quantification par HPLC

II.3.8.1 Dénaturation des protéines et extraction du rétinol

L'extraction du rétinol plasmatique a été réalisée comme décrit par Granado (Granado-Lorencio et al., 2006). Pour éviter la destruction du rétinol et réduire l'imprécision intra-essai, l'extraction s'est déroulée entièrement sous la lumière jaune et dans de la glace selon les étapes suivantes:

Le rétinol a été extrait à partir d'un volume de 800 µl de plasma mis dans un tube à hémolyse adapté auquel on a ajouté 800 µl d'éthanol contenant le standard interne (le rétinyl acétate) et à 0.1% d'antioxydant: BHT (butylhydroxytoluène). Après homogénéisation pendant 15 secondes/4 fois de la suspension obtenue, 2ml d'hexane à 0.1% BHT a été ajouté.

Afin de séparer la phase organique de la phase aqueuse, les tubes sont agités pendant 3 minutes, puis centrifugés à 5000 g pendant 2 minutes. La phase organique (0,8 ml) est prélevée dans un tube à vis, le reste du tube hémolyse initial est récupéré pour une deuxième extraction, 2 ml d'hexane à 0.1% BHT a été rajouté. Après homogénéisation pendant 2 min, les tubes sont centrifugés à 5000 g pendant 2 minutes. La phase organique a été prélevée de nouveau dans le tube à vis préalablement utilisé lors de la 1^{ère} extraction. Elle a été ensuite évaporée sous courant d'azote à une température

de +40°C. Le résidu sec a été repris dans 200 µl de méthanol et transvasé dans des vials ambrées en attendant l'injection dans la colonne du chromatographe.

II.3.8.2 Quantification du rétinol par HPLC

Pour quantifier le rétinol plasmatique, on a eu recours au chromatographe HPLC WHATMAN® équipé d'un détecteur UV/visible, d'un intégrateur SpectraPhysics 4270. Il est également couplé d'un mélangeur automatique de solvants et d'une boucle d'injection. La colonne montée sur le chromatographe était du type Spheri-5-ODS (Applied Biosystems, Foster City, CA). L'injection sur HPLC de l'extrait contenant le rétinol, a été faite en respectant les conditions chromatographiques suivantes:

Phase mobile	Acétonitrile/méthanol (85/15 ; v/v)
Débit	1,8 ml /min
Colonne	C18 250x4.0 5µm
Longueur d'onde	325nm
Volume d'injection	20 µl

La carence en vitamine A était définie par une concentration du rétinol plasmatique inférieure à 0,70 mmol / L (de Pee and Dary, 2002; WHO, 1996).

II.4 Analyses statistiques

II.4.1 Analyse des facteurs de prédisposition génétique

II.4.1.1 L'équilibre Hardy-Weinberg

Initialement, nous avons vérifié si la distribution des génotypes supposée qu'elle respecte l'équilibre Hardy-Weinberg en démontrant que cette hypothèse est acceptée (Hypothèse H0). Pour réaliser ceci et à partir des fréquences génotypiques observées pour chaque mutation (locus à 2 allèles A et a), les fréquences alléliques de l'allèle sauvage $f(A) = f(AA) + \frac{1}{2} f(Aa) = p$ et muté $f(a) = f(aa) + \frac{1}{2} f(Aa) = q$, ont été calculées, ce qui nous a permis de calculer les génotypes théoriques attendus : $f(AA) = p^2 \times N$ (N: effectif totale de la population) pour l'homozygote AA, $f(aa) = q^2 \times N$ pour l'homozygote aa, et $f(Aa) = 2pq \times N$ pour l'hétérozygote Aa.

Nous avons eu recours au test de khi2 pour calculer le χ^2 calculé afin de comparer les génotypes observés aux génotypes attendus ou théoriques. χ^2 calculé était inférieur au χ^2 théorique à ddl=1 et à 5 % de niveau de signification. La H0 est acceptée et la population est en équilibre Hardy-Weinberg.

II.4.1.2 Analyse statistique des fréquences alléliques et génotypiques

Nous avons calculé les fréquences alléliques et génotypiques chez les patients et contrôles

La différence entre les fréquences génotypiques et alléliques entre les malades et contrôles est appréciée à l'aide du test χ^2 . Les résultats dont les valeurs p est inférieur à 0,05 ont été considéré statistiquement significatifs. De plus, l'odds ratio (OR) avec un intervalle de confiance à 95% (IC) était calculé pour évaluer le risque d'association entre génotypes ou allèles et TB.

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant EPI INFOTM, version 7.1.0.6 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA; 8 septembre 2012).

II.4.1.3 Estimation des fréquences d'haplotypes

Le programme CubEX (Cubic exact solutions for the estimation of pairwise haplotype frequencies) a été utilisé pour estimer les fréquences d'haplotype (Gaunt et al., 2007). Ce programme est également capable de fournir le paramètre de déséquilibre de liaison normalisé (LD) (D') et le coefficient de corrélation LD entre deux loci (r2).

II.4.2 Analyses statistiques de la concentration du rétinol

Les différences de médianes entre les groupes pour les variables qui ne suivent pas la loi normale ont été mesurées par le test U de Mann-Whitney, alors que les différences de moyennes entre les paramètres ayant une distribution normale ont été testées en utilisant le test de Student-t. L'analyse

de variance à sens unique est utilisée pour comparer les taux plasmatiques de rétinol dans différents groupes d'âge. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives pour les valeurs de $p \leq 0,05$.

III Résultats

III.1 Identification d'un polymorphisme localisé dans la région 3'UTR du gène *NSMAF* génétiquement associé à la tuberculose

Article 1: New variant identified in major susceptibility locus to tuberculosis on chromosomal region 8q12-q13 in Moroccan population: a case control study

Mounia Orafli, Imane Asekkaj, Jamal Eddine Bourkadi, Rajae El Aouad, Khalid Sadki.

BMC Infect Dis. 2017; 17: 712. doi: 10.1186/s12879-017-2807-9

La réponse à l'infection par *Mtb* fait intervenir de nombreux mécanismes permettant de contrôler l'infection. Parmi ces mécanismes on trouve, l'apoptose ou la mort cellulaire programmée, c'est le processus par lequel des cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal. L'apoptose est un mécanisme important de défense de l'hôte qui empêche la croissance de bactéries et de virus intracellulaires, y compris *Mtb* (Arnett et al., 2018; Lamkanfi and Dixit, 2010), à l'inverse de la nécrose qui permet aux bactéries de s'échapper aux défenses de l'hôte et se propager (Gan et al., 2008; Zhai et al., 2019). Il a été démontré que les *Mtb* virulents détournent les mécanismes de défense innés du macrophage pour favoriser une nécrose des macrophages et bloquer les voies apoptotiques (Arnett et al., 2018; Sly et al., 2003; Yao et al., 2017). Le déclenchement de la majorité des voies de signalisation de l'apoptose engageant le TNF- α , dépend de sa capacité à activer le TNF-R1 (Montfort et al., 2010b). Parmi ces voies de signalisation, on trouve la voie qui implique une interaction spécifique entre le domaine NSD du TNFR1 et la protéine FAN (Adam et al., 1996). Cette interaction induit l'activation des sphingomyélinases neutres 2 et 3 ce qui déclenche l'activation de la voie «sphingomyéline-céramide». Il s'agit d'une hydrolyse transitoire de la sphingomyéline par une sphingomyélinase conduisant à la production de la céramide (Levade and Jaffrézou, 1999). A son tour la céramide participe à l'induction de l'apoptose via l'activation des caspases par un mécanisme dépendant du relargage du cytochrome C dans le cytosol (Cuvillier et al., 2000).

De façon intéressante, il a été démontré qu'avec l'expression stable d'une forme dominante négative de FAN dans les fibroblastes humains, l'apoptose TNF- α -dépendante est inhibée ainsi que l'activation de la caspase et la libération de cytochrome c (Ségui et al., 1999). Ce qui témoigne l'importance de la protéine FAN dans cette voie signalétique. La protéine FAN est codée par le gène *NSMAF* (Kreder et al., 1999b); Nous avons suggéré qu'il pourrait être un bon gène candidat à explorer surtout si l'on considère sa localisation chromosomique. En effet, le gène *NSMAF* est localisé au sein de la région chromosomique 8q12-q13 décrite comme un locus de susceptibilité

majeur à la TB dans la population marocaine (Baghdadi et al., 2006), où deux variants génétiques associés à la TB ont été identifiés (Grant et al., 2013; Qrafli et al., 2014).

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons mené une étude cas-témoins comprenant 269 patients tuberculeux et témoins sains. Nous avons génotypé trois SNP sélectionnés (rs2228505, rs36067275 et rs10505004) par la technique TaqMan® de discrimination allélique. L'analyse de nos résultats a révélé que le génotype CT rs1050504 est associé de manière significative à un grand risque de développer une TB pulmonaire (41,8% contre 27%, OR 1,95, IC 95% 1,16–3,27; $p = 0,01$). En revanche, le génotype TT est associé de manière hautement significative à la protection contre la PTB (4,1% vs 15,6%, OR 0,23, IC 95% 0,08–0,63; $p = 0,002$).

Nos résultats suggèrent que les variations génétiques du gène *NSMAF* pourraient moduler le risque de développer une PTB dans une population marocaine. D'autres études fonctionnelles sont nécessaires pour confirmer ces résultats.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



New variant identified in major susceptibility locus to tuberculosis on chromosomal region 8q12-q13 in Moroccan population: a case control study

Mounia Qraflı¹, Imane Asekkaj¹, Jamal Eddine Bourkadi³, Rajae El Aouad² and Khalid Sadki^{1*} 

Abstract

Background: Tuberculosis (TB) remains a global health problem. Several studies have implicated genetic host factors in predisposing populations to TB disease. In this study, we have selected *NSMAF* (Neutral Sphingomyelinase Activation Associated Factor) as a candidate gene to evaluate its level of association with TB disease in a Moroccan population for two reasons: first, this gene is located in a major susceptibility locus on chromosomal region 8q12-q13 in the Moroccan population, closely linked to the *CYP7A1* gene, which was previously shown to be associated with TB disease; second, *NSMAF* has an important role in immune system function.

Methods: We conducted a case-control study including 269 genomic DNA samples extracted from pulmonary TB (PTB) patients and healthy controls (HC). We genotyped three selected SNPs (rs2228505, rs36067275 and rs10505004) using TaqMan® allelic discrimination assays.

Results: Only the rs1050504 C > T genotype was observed to be significantly associated with an increased risk for developing pulmonary TB (41.8% vs 27%, OR 1.95, 95% CI 1.16–3.27; $p = 0.01$). In contrast, the TT genotype was significantly associated with resistance to PTB (4.1% vs 15.6%, OR 0.23, 95% CI 0.08–0.63; $p = 0.002$).

Conclusion: Our findings suggest that genetic variations in the *NSMAF* gene could modulate the risk of PTB development in a Moroccan population. Further functional studies are needed to confirm these findings.

Keywords: Tuberculosis, *NSMAF*, Moroccan, Apoptosis

Background

Tuberculosis (TB) is one of the oldest infectious diseases that is still a serious health challenge in the developing world. According to a recent report published by the World Health Organization, TB killed 1.5 million people in 2015 [1]. In Morocco, the Ministry of Health registered high incidence in 2015, reaching 89 new cases per 100,000 inhabitants [2].

TB is a multifactorial disease, and thus, identifying host genes that determine its susceptibility is far from an easy task. For this reason, candidate gene studies are receiving

increasing attention in genetic epidemiology. This method begins with the selection of a putative candidate gene followed by the selection of genetic polymorphisms based on its predicted function. Hence, by focusing directly on genetic variations within a gene of interest, this approach offers considerable advantages in terms of detecting disease-associated genes [3–5].

In the Moroccan population, a few studies have been conducted in this context, with some reporting a significant association between TB disease and genetic variants in *MIF*, *PTPN22*, *VDR*, *CYP7A1* and *STAT4* [6–10]. Furthermore, it seems that the major susceptibility locus for TB in the Moroccan population is located on chromosomal region 8q12-q13 [11].

Two genetic variants associated with TB have been identified. The first one is rs3808607 in the *CYP7A1* gene, and

* Correspondence: ksadki1@yahoo.fr; khalidsadki1@gmail.com

¹Physiopathology Team, Immunogenetics and Bioinformatics Unit, Genomic Center of Human Pathologies, Faculty of Sciences, Mohammed V University, Rabat, Morocco

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

the second is rs1568952, located 6 kb downstream of the last *TOX* gene exon. The *NSMAF* gene is located [12] between the *CYP7A1* and *TOX* genes (Fig. 1).

The *NSMAF* (Neutral Sphingomyelinase Activation Associated Factor) gene encodes for the protein NSMAF or FAN (factor associated with neutral sphingomyelinase activation) [14]. NSMAF is a 140 kDa WD-repeat protein composed of 917 aa [15, 16]. This protein interacts specifically with the cytoplasmic sphingomyelinase activation domain of the 55kD tumour necrosis factor receptor, known as Tumour Necrosis Factor Receptor Type I (*TNFR1*) or p55(CD120a), also called NSD (neutral sphingomyelinase domain). Indeed, the FAN protein is an essential component of the activation of TNF- α induced neutral sphingomyelinase 2 and 3 [17, 18], leading to activation of the sphingomyelin-ceramide pathway. In fact, this biological event is initiated by the hydrolysis of sphingomyelin to ceramide, the lipid second messenger implicated in cell signalling [19].

In addition, with stable expression of a dominant-negative form of FAN in human fibroblasts, caspase activation and cytochrome c release from mitochondria are reduced, and the TNF- α -triggered apoptosis is obviously inhibited [20]. Furthermore, FAN contributes to the inflammation process and is required for full expression of the genes encoding CXCL2 and IL-6 [21]. Overexpression of FAN in rat cardiomyocytes was shown to lead to increased cell death [22]. Interestingly, *NSMAF* is also associated with multiple sclerosis [23, 24], and one study demonstrated that FAN can promote melanoma cellular motility and tumour invasiveness in an in vivo model [25].

Taking all these findings together, there are several lines of evidence to support the possible involvement of *NSMAF* in TB development; therefore, it could be postulated as a candidate gene of susceptibility in TB disease. The aim of this work is to evaluate the impact of selected *NSMAF* polymorphisms on TB susceptibility in the Moroccan population.

Methods

Study design

We conducted a case-control study in the Moroccan population. 10 ml of peripheral blood was collected in ethylenediaminetetraacetic acid tubes from all participants recruited over the course of 2 years. The blood samples were collected from 19 health centres comprising the Centres of TB Treatment and Respiratory Disease (CTRD) and the university hospitals for PTB patients. Patients were evaluated by microbiological diagnosis, physical examination and chest X-rays; all patients were smear positive for acid-fast bacilli and mycobacterial culture and were tuberculin skin test positive. HC group consisted of healthy donors with no signs, symptoms or history of previous tuberculosis. They were tuberculin skin negative and remained in this immunological status during the 2 years after recruitment in a posterior telephonic "check-contact". The recruitment was done from the Regional Centers of Blood Transfusion (RCBT) of five different regions of Morocco (Oujda, Fez, Tangier, Rabat, and Marrakech). All subjects were negatives for HIV-1/2 infection (tested by AxSYM Assays, Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA). This study was approved by the local ethics committee (faculty of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University of Rabat, as reference number 1169), and informed written consent was obtained from all subjects. Structured questionnaires were used to collect medical history data, biological investigations and demographic parameters (Table 1). The questionnaire analyses show that the sex ratio (males /females) among TB patients was almost similar to that of the HC group (2.76 vs 2.52, respectively). The mean age $\pm$ standard deviation was 33.43 ($\pm$ 13.24) years, ranging from 18 to 67 years, and 32.41 ($\pm$ 11.10) years, ranging from 18 to 61 years, for patients and HC, respectively (Table 1).

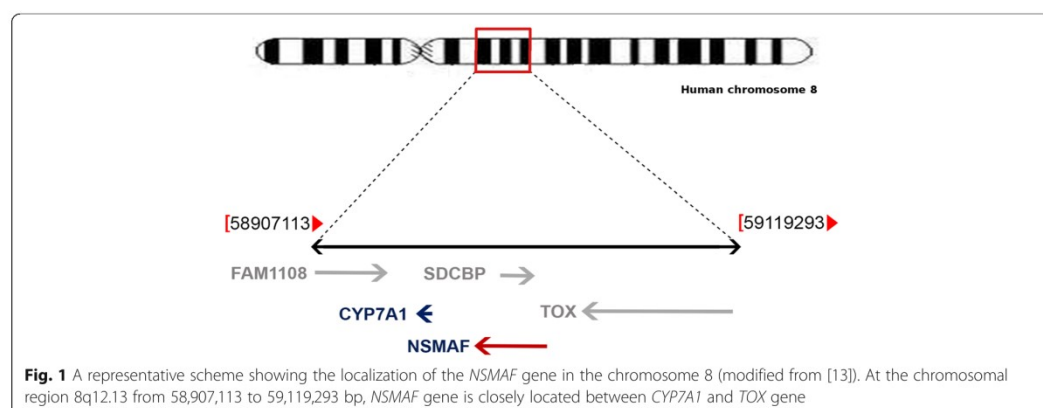


Table 1 Demographic and clinical characteristics of tuberculosis patients and healthy controls

Variables	TB patients N = 128		Healthy controls N = 141	
Age (Mean age $\pm$ SD)	33.43 $\pm$ 13.24		32.41 $\pm$ 11.10	
Gender [n (%)]				
Men	94	73.4%	101	71.6%
Women	34	26.6%	40	28.4%
Clinical feature				
Hemoptysis	55/128	43%		
Expectoration	117/128	91%		
Fever	112/128	87%		
Cough	125/128	98%		
weight loss	122/128	95%		
Abnormality shown by chest X-ray examination	128/128	100%		

NSMAF genotyping

DNA extraction: Total genomic DNA was extracted from the peripheral blood of all TB patients and HC using a QIAampDNA Blood Maxi kit (QIAamp® DNA Blood Mini Kit, Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and was stored at -20°C until use.

NSMAF selected SNPs: Three SNPs of the NSMAF gene were selected for genotyping. The first SNP, rs36067275 C > T, is a missense mutation causing a substitution of glutamic acid by lysine at 487. The second SNP, rs2228505 T > C, is a missense mutation causing a substitution of tyrosine by cysteine at position 626. The third is located in the 3' UTR (untranslated region) represented by rs1050504 C > T.

Real time PCR genotyping: The three selected SNPs were genotyped by Real time PCR technology using a TaqMan® Genotyping Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA). Reactions were performed as recommended by the manufacturer (Applied Biosystems). PCR allelic discrimination was performed on a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), which measured the specific allele fluorescence of each sample. Impaired samples were genotyped twice.

Statistical analysis

Allele and genotype frequencies between PTB patient and HC were determined by direct counting and were compared afterward using the χ^2 -test. Patients and controls were tested for conformity to Hardy-Weinberg equilibrium. All statistical analyses were performed using EPI INFO™, version 7.1.0.6 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA; 08 September 2012). We considered the results with corresponding *p*-values below 0.05 to be statistically significant. Moreover, the odds ratio (OR) with a 95% confidence interval (CI) was calculated to evaluate the risk of association between genotypes or alleles and TB disease.

To estimate the haplotype frequencies, the program CubEX was used [26]. This program is also able to provide the normalized linkage disequilibrium (LD) parameter (D') and the LD correlation coefficient between two loci (r^2).

Results

All genotype frequencies of patients and HC were consistent with respect to Hardy-Weinberg equilibrium.

There were no significant differences between patients and HC in the distribution of genotypes and allele frequencies for either rs36067275 C/T or rs2228505 T/C SNPs (Table 2). Nevertheless, despite the significant difference not being reached for allele distribution between the groups for rs2228505 T/C SNP, the mutant allele C was more frequent in patients than in controls (14.06% in patients versus 9.32% in controls, $p = 0.1$, OR = 1.59, 95% CI = 0.9–2.79) (Table 3). However, a statistical analysis of genotype distribution for the rs1050504 polymorphism yielded an interesting result. A significant and positive association was found between the CT genotype and an increased risk of PTB development (41.8% vs 27%, OR 1.95, 95% CI 1.16–3.27; $p = 0.01$). Conversely, the TT genotype frequency was statistically more

Table 2 Genotypes and alleles frequencies for the rs36067275 polymorphism in pulmonary tuberculosis patients and healthy controls

Controls				
Patients vs Controls				
rs36067275 [C/T]	PTB N = 112 (%)	HC N = 116 (%)	p-value	OR (95% CI)
Genotypes (N)				
CC	112(100)	116(100)	> 0,05	
CT	0	0		
TT	0	0		
Alleles (2 N)				
C	224 (100)	232 (100)	> 0,05	
T	0	0		

CI confidence interval, OR odds ratio

Table 3 Genotypes and alleles frequencies for the rs2228505 polymorphism in pulmonary tuberculosis patients and healthy controls

Patients vs Controls				
rs2228505 [T/C]	PTB N = 128 (%)	HC N = 118 (%)	p-value	OR (95% CI)
Genotypes (N)				
TT	95 (74,2)	96 (81,4)	0,17	0,65 (0,35–1,21)
CT	30 (23,4)	22 (18,6)	0,35	1,33 (0,72–2,47)
CC	3 (2,4)	0	0,09	ND
Alleles (2 N)				
T	220 (85,9)	214 (90,7)	0,1	0,62 (0,35–1,1)
C	36 (14,1)	22 (9,3)		1,59 (0,9–2,79)

frequent in HC than in patients (15.6% vs 4.1%, OR 0.23, 95% CI 0.08–0.63; $p = 0.002$, respectively) (Table 4).

✓ Stratification by sex and age

We also carried out the genetic analysis by sex and age stratification and evaluated the risk for TB development in subjects carrying each relevant genotype. We observed a significant difference in high frequency of the rs1050504 CT genotype in males, but not females, for PTB disease (42.2% vs 25.7%, OR 2.1, 95% CI 1.14–3.88; $p = 0.01$) (Table 5). In contrast, our data show that the TT genotype was more frequent in HC males than in PTB males (4.5% vs 18.8%, OR 0.2, 95% CI 0.06–0.62; $p = 0.002$) (Table 5). Additionally, when taking into consideration the age factor, statistical analysis revealed that the numbers of patients between ages 30 and 49 carrying the rs1050504 TT genotype were significantly fewer than their homologous subjects in the HC group (3.3% vs 6.8%, OR 0.22, 95% CI 0.06–0.82; $p = 0.002$) (Table 6).

However, after stratification by sex and age, no evidence of genetic associations between rs2228505 and PTB disease was found.

✓ Haplotype analysis

We did a haplotype analysis for two SNPs: rs1050504 and rs3808607. rs3808607 is located in the promoter

Table 4 Genotypes and alleles frequencies of the rs1050504 polymorphism in pulmonary tuberculosis patients and healthy controls

Patients vs Controls				
rs1050504 [C/T]	PTB N = 122 (%)	HC N = 141 (%)	p-value	OR (95% CI)
Genotypes (N)				
CC	66 (54.1)	81 (57.4)	0.58	0.87 (0.53–1.42)
CT	51 (41.8)	38 (27)	0.01*	1.95 (1.16–3.27)
TT	5 (4.1)	22 (15.6)	0.002*	0.23 (0.08–0.63)
Alleles (2 N)				
C	183 (75)	200 (70.9)	0.29	1.23 (0.83–1.81)
T	61 (25)	82 (29.1)		

*Significant p-values appear in bold

region of the *CYP7A1* gene and has been associated with TB in the same population [8].

In healthy individuals, all nine possible diplotypes combinations were found. However, only eight diplotypes were found in PTB patients. Interestingly, data analysis found that the CT /AA diplotype was significantly more frequent in PTB patients in comparison to healthy controls and appeared to be associated with an increased risk for the development of pulmonary TB (12% vs. 1%, OR 13.5, 95% CI 1.72–105.9; $p = 0.0006$) (Table 7).

When we analysed the four possible haplotypes, no significant difference was observed between PTB patients and healthy controls (Table 8).

Moreover, the analysis of linkage disequilibrium (LD) revealed that the polymorphisms rs3808607 and rs1050504 were in low LD. The correlation (r^2) between these two SNPs in patients and controls was weak (0.05 vs 0.08). In addition, the D' data also showed evidence of a low LD between these SNPs. In patients, rs3808607 and rs1050504 are coinherited roughly 34% of the time. Therefore, the two SNPs are in weak LD in patients ($D' = 0.34$) more than the in control group, where these two polymorphisms are coinherited approximately 58% of the time ($D' = 0.58$).

Discussion

In Morocco, despite efforts that have been deployed, including the setup of a national tuberculosis programme, there is still a long way to go in the fight against TB.

Tuberculosis is a multifactorial disease wherein several parameters in the form of host genetic factors could affect disease outcome. In this regard, numerous studies have reported the crucial role played by the host genetic factors in term of the development of TB disease [27–30].

In the present study, we report for the first time a strong association between the rs1050504 *NSMAF* polymorphism and PTB disease in the Moroccan population. Our data show that the CT genotype is a susceptibility marker for TB and that the mutant TT genotype for rs1050504 plays a protective role against TB. Scarce data has been reported concerning the involvement of this variant on the outcome of TB disease. However, if we take in consideration the particular localization of rs1050504 SNP in 3'UTR (untranslated region) of the *NSMAF* gene, we could generate a hypothesis to explore our finding. In fact, it has been reported in several works that SNPs located in untranslated regions of genes may interfere with mRNA stability and translation, including causing a change in recognition sites for microRNAs (miRNA), RNA-binding proteins, and the polyadenylation machinery [31, 32]. Therefore, 3'UTR variants may result in observed differences in gene expression [32].

In this context, a recent genome-wide association study (GWAS) has reported that the rs1050504-C wild-type

Table 5 Distribution by sex of allele and genotype frequencies of the rs1050504 and rs2228505 polymorphisms between pulmonary tuberculosis patients and healthy controls

	PTB patients		Controls		TB male vs healthy male		TB female vs healthy female	
	M (%)	F (%)	M (%)	F (%)	p-value	OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)
rs1050504 [C/T]								
Genotypes	n = 90	n = 32	n = 101	n = 40				
CC	48 (53,3)	18 (56,3)	56 (55,5)	25 (62,5)	0,76	0,91 (0,51–1,62)	0,59	0,77 (0,29–1,98)
CT	38 (42,2)	13 (40,6)	26 (25,7)	12 (30)	0,01*	2,1 (1,14–3,88)	0,34	1,59 (0,6–4,24)
TT	4 (4,5)	1 (3,1)	19 (18,8)	3 (7,5)	0,002*	0,2 (0,06–0,62)	0,42	0,39 (0,03–4,02)
Alleles								
C	134(74,4)	49 (76,6)	138 (68,3)	62 (77,5)	0,16	1,37(0,87–2,14)	0,89	0,94 (0,43–2,07)
T	46 (25,6)	15 (23,4)	64 (31,7)	18 (22,5)				
rs2228505 [T/C]								
Genotypes	n = 94	n = 34	n = 78	n = 40				
TT	64 (68,1)	31 (91,2)	62 (79,5)	34 (85)	0,09	0,55 (0,27–1,1)	0,41	1,82 (0,41–7,9)
CT	27 (28,7)	3 (8,8)	16 (20,5)	6 (15)	0,21	1,56 (0,76–3,17)	0,41	0,54 (0,12–2,38)
CC	3 (3,2)	0	0	0	0,11	ND	ND	ND
Alleles								
T	155(82,4)	65 (95,6)	140 (89,7)	74 (92,5)	0,53	0,53 (0,28–1,01)	0,43	1,75 (0,42–7,3)
C	33 (17,6)	3 (4,4)	16 (10,3)	6 (7,5)				

ND not determined; *Significant p-values appear in bold

Table 6 Distribution by age of allele and genotype frequencies of the rs1050504 and rs2228505 polymorphisms between pulmonary tuberculosis patients and healthy controls

	≤ 29 years				30–49 years				≥ 50 years			
	PTB (%)	Controls (%)	p-Value	OR (95% CI)	PTB (%)	Controls (%)	p-Value	OR (95% CI)	PTB (%)	Controls (%)	p-Value	OR (95% CI)
rs1050504[C/T]												
Genotypes	n = 60	n = 44			n = 49	n = 81			n = 13	n = 16		
CC	31 (51,7)	29 (65,9)	0,14	0,55 (0,24–1,27)	28 (57,1)	43 (53,1)	0,65	1,17 (0,57–2,4)	8 (61,5)	9 (56,2)	0,91	1,08 (2,23–4,94)
CT	27 (45)	12 (27,3)	0,06	2,18 (0,94–5,03)	18 (36,8)	20 (24,7)	0,14	1,77 (0,82–3,82)	5 (38,5)	6 (37,5)	0,82	1,19 (0,25–5,49)
TT	2 (3,3)	3 (6,8)	0,41	0,47 (0,07–2,94)	3 (6,1)	18 (22,2)	0,01*	0,22 (0,06–0,82)	0	1 (6,3)	0,37	ND
Alleles												
C	89 (74,2)	70 (79,5)	0,36	0,73 (0,38–1,42)	74 (75,5)	106 (65,4)	0,08	1,62 (0,92–2,85)	19 (79,2)	24 (75)	0,71	1,26 (0,35–4,5)
T	31 (25,8)	18 (20,5)			24 (24,5)	56 (34,6)			5 (20,8)	8 (25)		
rs2228505[T/C]												
Genotypes	n = 64	n = 40			n = 52	n = 62			n = 12	n = 15		
TT	47 (73,5)	31 (77,5)	0,64	0,80 (0,31–2,02)	38 (73,1)	52 (83,9)	0,15	0,52 (0,20–1,30)	10 (83,3)	12 (80)	0,82	1,25 (0,17–9,01)
CT	15 (23,4)	9 (22,5)	0,91	1,05 (0,41–2,7)	13 (25)	10 (16,1)	0,23	1,73 (0,68–4,36)	2 (16,7)	3 (20)	0,82	0,8 (0,11–5,77)
CC	2 (3,1)	0	0,25	ND	1 (1,9)	0	0,27	ND	0	0	ND	ND
Alleles												
T	109 (85,2)	71 (88,7)	0,46	0,72 (0,31–1,69)	89 (85,6)	114 (92)	0,12	0,52 (0,22–1,21)	22 (91,7)	27 (90)	0,83	1,22 (0,18–7,97)
C	19 (14,8)	9 (11,3)			15 (14,4)	10 (8)			2 (8,3)	3 (10)		

*Significant p-values appear in bold

Table 7 Distribution of the rs3808607 and rs1050504 diplotype frequencies in pulmonary tuberculosis patients and healthy controls

Diploypes	PTB Patients (n = 68) (%)	Controls (n = 90) (%)	p-value	OR (95% CI)
CC/AA	19 (28)	24 (27)	0.43	1.05 (0.56–1.95)
CT/AA	8 (12)	1 (1)	0.0006*	13.5 (1.72–105.9)
TT/AA	0	1 (1)	0.25	Undefined
CC/AC	16 (24)	28 (31)	0.13	0.7 (0.37–1.31)
CT/AC	13 (20)	18 (20)	0.5	1 (0.5–1.99)
TT/AC	1 (1)	1 (1)	0.5	1 (0.06–16.2)
CC/CC	5 (7)	11 (12)	0.12	0.55 (0.2–1.46)
CT/CC	5 (7)	5 (6)	0.39	1.17 (0.38–3.64)
TT/CC	1 (1)	1 (1)	0.5	1 (0.06–16.2)

*Significant p-values appear in bold

allele is located in a putative miRNA binding site for miR-154-3p [33], reported to act as a tumour suppressor in several types of malignancies [34, 35]. In a mutant allele, this miRNA binding site becomes another binding site, the role of which has not yet been explored [33]. This finding is of particular interest, especially when we know that FAN, the protein encoded by *NSMAF*, is implicated in apoptotic signalling [20, 22, 36]. Apoptosis is considered a particular innate defence against Mtb, and it is associated with diminished pathogen viability in infected macrophages [37, 38]. As a result, virulent Mtb strains have developed a capacity to disrupt this mechanism by various means, such as through expression of the anti-apoptotic Bcl-2 (B-cell lymphoma/leukaemia 2) family, which can block the release of cytochrome c from mitochondria [39].

Taken together, we can hypothesize that the presence of the CT genotype could create conditions leading to downregulation of FAN. Conversely, the rs1050504TT SNP could decrease the ability of miRNA to down-regulate FAN, theoretically leading to increased FAN production. In turn, increased FAN could enhance apoptotic signalling to protect against PTB and/or likely affect other roles FAN plays in anti-TB immune

response, such as Actin reorganization in macrophages [40] and navigational capacity of leucocytes chemotactic response [41], or its documented role in TNF- α induced neutrophil migration in mouse peritonitis models [21].

However, we cannot exclude the possibility that the association between the rs1050504 SNP and PTB may be secondary to the presence of one or more different variants in close linkage disequilibrium with the *NSMAF* gene or other genes. In particular, this candidate gene is located within the chromosomal region 8q12-q13, characterized by a high LOD score of susceptibility to PTB in the Moroccan population [11]. In addition, more recently, other SNPs located in genes that are closely linked to the *NSMAF* gene, *TOX* (rs2726600 and rs1568952) and *CYP7A1* (rs3808607), have been associated with PTB [8, 42].

After stratification analysis, our data show that the association is maintained only in males but not in females. Males with the rs1050504 CT genotype are more susceptible to PTB, in contrast to those with the TT, which seems to be protective against PTB. These data reinforce the sexual inequality with respect to predisposition to TB; worldwide epidemiological data report that the majority of TB patients are male [43, 44]. This sex discrimination could be due to the sex hormones [43–45]. A previous finding reported that testosterone is immunosuppressive and impairs macrophage activation [46], while oestrogens are pro-inflammatory mediators able to induce the production of TNF- α and stimulate secretion of INF- γ [47, 48].

Interestingly, in our study, the patients between ages 30 and 49 with the TT genotype appeared to be at decreased risk of developing PTB (OR 0.22; $p = 0.002$). Theoretically, the *NSMAF* gene interacts with other genes encoding for cytokines or their receptors that play an essential role in defence against TB. This polygenic aspect of susceptibility to TB might in part explain our finding. When taking into account that genetic variants

Table 8 Distribution of the rs3808607 and rs1050504 haplotype frequencies and LD statistics in pulmonary tuberculosis patients and healthy controls

Haplotype	Haplotype frequencies %		p-value	
	PTB	CTRL		
A-C	53	51	0.38	1.08 (0.62–1.89)
A-T	9	4	0.08	2.37 (0.7–7.97)
C-C	25	32	0.13	0.7 (0.38–1.31)
C-T	13	13	0.5	1 (0.43–2.28)
LD statistics	PTB	CTRL		
D'	0.34	0.58		
r ²	0.05	0.08		

affecting genes encoding for cytokines or their receptors could be influenced by age and sex, as reported with the AA genotype variant of +874 A/T, affecting the IFN- γ gene was associated with active PTB in men (OR 2.42) aged 30–49 years [49].

Analysis of the LD measures revealed that two SNPs (rs3808607 and rs1050504) are in LD. Nevertheless, the values of D' and r^2 indicated that this LD is low. Moreover, our results showed that when the AA rs3806607 genotype and CT rs1050504 genotype are coinherited, the susceptibility to develop TB is strongly significant (OR 13.5; $p = 0.0006$). These data confirm our previous finding wherein the AA rs3808607 genotype of the *CYP7A1* gene is more frequent in PTB patients compared to HC (OR 1.93; $p = 0.02$) [8]. However, the lack of association between rs2228505 and rs36067275 SNPs and PTB in our study, at both the allelic and genotypic levels, could be explained by the absence of the effect of these genetic variants occurring at their positions.

In our study, we report for the first time the allele frequencies of these three SNPs in the Moroccan population, which could be used for others studies in the context of their potential involvement in other diseases. Indeed, data analysis of the rs1050504 SNP revealed that the T mutant allele frequency observed in the Moroccan population (0.29) is close to that reported in Han Chinese (0.32) and Caucasian (0.34) populations and higher than the frequencies observed in Japanese (0.2) and Sub-Saharan African populations (Yoruba) (0.08).

When we analysed the data for the rs2228505-C mutant allele, the allele frequency was 0.09 in Moroccan population, which is similar to that observed in the Sub-Saharan African population (Yoruba) (0.1), but it is much lower than that observed in the Han Chinese and Japanese (0.22, 0.33, respectively) and higher than that in the Caucasian population (CEU) (0.01). Therefore, it will be very interesting to evaluate the impact of the polymorphism of this variant in Chinese and Caucasian TB populations.

Concerning the result of the rs36067275 C > T SNP, we found that the T mutant allele is absent in the Moroccan population as observed in Caucasian (CEU), Han Chinese (HCB) and Japanese (JPT) populations. However, in the Sub-Saharan African population (Yoruba), this allele is present at 0.02 frequency [50].

Conclusion

In summary, our results suggest that the rs1050504 *NSMAF* SNP may have an impact on the susceptibility or resistance to PTB in the Moroccan population. We are, however, fully aware that the limitation of the current study is its small size. Hence, further studies using larger samples in ethnically diverse populations are needed to better understand the involvement of *NSMAF* in protection against TB. In addition, functional studies are highly

recommended in order to evaluate the involvement of the *NSMAF* gene or its product in TB development.

Abbreviations

3'UTR: Untranslated region; Bcl-2: B-cell lymphoma/leukaemia 2; CI: Confidence interval; HC: Healthy controls; INF- γ : Interferon-gamma; LD: Linkage disequilibrium; Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*; NSD: Neutral sphingomyelinase domain; *NSMAF*: Neutral sphingomyelinase activation associated factor; OR: Odds ratio; TB: Tuberculosis; TNFRI: Tumour necrosis factor receptor type I; TNF- α : Tumour necrosis factor-alpha

Acknowledgements

We would like to thank all patients and healthy controls for their participation. We are sincerely grateful to the clinicians and nurses of the different prefectures (Marrakech, Rabat, Temara, Fes, Oujda, Tanger and Casablanca) for their collaboration.

Funding

This study was supported by research grants from the Hassan II Academy of Science and Technology, Kingdom of Morocco (Grant number 1169). It was also supported by the H3ABioNet project: a sustainable African Bioinformatics Network for H3Africa (Grant number 5U41HG006941). The funders had no role in the design of the study or data analysis and they have not seen the manuscript.

Availability of data and materials

The dataset of the current study is available from the corresponding author at a reasonable request.

Authors' contributions

MQ participated in sampling, SNP genotyping of *NSMAF* gene, and data analysis and drafted the manuscript; IA participated in sampling and SNP genotyping of the *NSMAF* gene; JEB was in charge of patient recruitment and clinical evaluation; RE participated in the design and coordination of the project; and KS participated in the conception and design of the study and review of the final manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

The participants signed an informed consent form. The study protocol was approved by the Ethical Committee for Biomedical Research, Faculty of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University of Rabat.

Consent for publication

Not applicable

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Physiopathology Team, Immunogenetics and Bioinformatics Unit, Genomic Center of Human Pathologies, Faculty of Sciences, Mohammed V University, Rabat, Morocco. ²Académie Hassan II des Sciences et Techniques, Rabat, Morocco. ³Pneumo-Phthisiology Department, Moulay Youssef Hospital, CHU of Rabat, Rabat, Morocco.

Received: 20 June 2017 Accepted: 20 October 2017

Published online: 07 November 2017

References

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2015. Available from: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. Accessed on 4 Oct 2016.
2. Direction de l'Epidémiologie et de Lutte Contre les Maladies. Situation épidémiologique de la TB au Maroc-en 2015. 2015. Available from : http://www.sante.gov.ma/Documents/2016/03/Situation_%C3%A9pidimio_de_la_TB_au_Maroc__2015%20Fr%20V%202020%20%20mars.pdf. Accessed on 9 Nov 2016.

3. Daly AK, Day CP. Candidate gene case-control association studies: advantages and potential pitfalls. *Br J Clin Pharmacol*. 2001;52:489–99.
4. Khoury MJ, Yang Q. The future of genetic studies of complex human diseases: an epidemiologic perspective. *Epidemiol Camb Mass*. 1998;9:350–4.
5. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*. 1996;273:1516–7.
6. Arji N, Busson M, Iraqi G, Bourkadi JE, Benjouad A, Bouayad A, et al. Genetic diversity of TLR2, TLR4, and VDR loci and pulmonary tuberculosis in Moroccan patients. *J Infect Dev Ctries*. 2014;8:430–40.
7. Lamsyah H, Rueda B, Baassi L, Elaouad R, Bottini N, Sadki K, et al. Association of PTPN22 gene functional variants with development of pulmonary tuberculosis in Moroccan population. *Tissue Antigens*. 2009;74:228–32.
8. Qraflı M, Amar Y, Bourkadi J, Ben Amor J, Iraqi G, Bakri Y, et al. The CYP7A1 gene rs3808607 variant is associated with susceptibility of tuberculosis in Moroccan population. *Pan Afr Med J*. 2014;18:1.
9. Sabri A, Grant AV, Cosker K, El Azbaoui S, Abid A, Abderrahmani Rhoifi I, et al. Association study of genes controlling IL-12-dependent IFN- γ immunity: STAT4 alleles increase risk of pulmonary tuberculosis in Morocco. *J Infect Dis*. 2014; 210:611–618.
10. Sadki K, Lamsyah H, Rueda B, Akil E, Sadak A, Martin J, et al. Analysis of MIF, FCGR2A and FCGR3A gene polymorphisms with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Moroccan population. *J Genet Genomics Yi Chuan Xue Bao*. 2010;37:257–64.
11. Baghdadi JE, Orlova M, Alter A, Ranque B, Chentoufi M, Lazrak F, et al. An autosomal dominant major gene confers predisposition to pulmonary tuberculosis in adults. *J Exp Med*. 2006;203:1679–84.
12. Zhang Y, Kreder D, Schwandner R, Krut O, Scherer G, Adam-Klages S, et al. Assignment of the human FAN protein gene (NSMAF) to human chromosome region 8q12–q13 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*. 1999;87:115–6.
13. The National Center for Biotechnology Information. 2017. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>. Accessed on 24 May 2017.
14. Kreder D, Krut O, Adam-Klages S, Wiegmann K, Scherer G, Plitz T, et al. Impaired neutral sphingomyelinase activation and cutaneous barrier repair in FAN-deficient mice. *EMBO J*. 1999;18:2472–9.
15. Adam-Klages S, Schwandner R, Adam D, Kreder D, Bernardo K, Krönke M. Distinct adapter proteins mediate acid versus neutral sphingomyelinase activation through the p55 receptor for tumor necrosis factor. *J Leukoc Biol*. 1998;63(6):678–82.
16. Adam-Klages S, Adam D, Wiegmann K, Struve S, Kolanus W, Schneider-Mergener J, et al. FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase. *Cell*. 1996;86:937–47.
17. Krut O, Wiegmann K, Kashkar H, Yazdanpanah B, Krönke M. Novel tumor necrosis factor-responsive mammalian neutral sphingomyelinase-3 is a C-tail-anchored protein. *J Biol Chem*. 2006;281:13784–93.
18. Philipp S, Puchert M, Adam-Klages S, Tchikov V, Winoto-Morbach S, Mathieu S, et al. The Polycarbonyl group protein EED couples TNF receptor 1 to neutral sphingomyelinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:1112–7.
19. Séguı B, Andrieu-Abadie N, Jaffrézou J-P, Benoist H, Levade T. Sphingolipids as modulators of cancer cell death: potential therapeutic targets. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1758(12):2104–20.
20. Séguı B, Andrieu-Abadie N, Adam-Klages S, Meilhac O, Kreder D, Garcia V, et al. CD40 signals apoptosis through FAN-regulated activation of the sphingomyelin-ceramide pathway. *J Biol Chem*. 1999;274:37251–8.
21. Montfort A, de Badts B, Douin-Echinard V, Martin PGP, Iacovoni J, Nevoit C, et al. FAN stimulates TNF(α)-induced gene expression, leukocyte recruitment, and humoral response. *J Immunol*. 2009;183(8):5369–78.
22. O'Brien NW, Gellings NM, Guo M, Barlow SB, Glembotski CC, Sabbadini RA. Factor associated with neutral sphingomyelinase activation and its role in cardiac cell death. *Circ Res*. 2003;92:589–91.
23. Arthur AT, Armati PJ, Bye C, Heard RN, Stewart GJ, Pollard JD, et al. Genes implicated in multiple sclerosis pathogenesis from consilience of genotyping and expression profiles in relapse and remission. *BMC Med Genet*. 2008;9:17.
24. Goris A, Sawcer S, Vandenbroeck K, Carton H, Billiau A, Setakis E, et al. New candidate loci for multiple sclerosis susceptibility revealed by a whole genome association screen in a Belgian population. *J Neuroimmunol*. 2003;143:65–9.
25. Boeck A, Carstens AC, Neacsu CD, Baschuk N, Haubert D, Kashkar H, et al. TNF-receptor-1 adaptor protein FAN mediates TNF-induced B16 melanoma motility and invasion. *Br J Cancer*. 2013;109:422–32.
26. Gaunt TR, Rodríguez S, Day IN. Cubic exact solutions for the estimation of pairwise haplotype frequencies: implications for linkage disequilibrium analyses and a web tool "CubeX". *BMC Bioinf*. 2007;8:428.
27. Bellamy R, Beyers N, McAdam KP, Ruwende C, Gie R, Samaai P, et al. Genetic susceptibility to tuberculosis in Africans: a genome-wide scan. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:8005–9.
28. Casanova J-L, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:581–620.
29. Comstock GW. Tuberculosis in twins: a re-analysis of the Proffit survey. *Am Rev Respir Dis*. 1978;117(4):621–4.
30. Kallmann FJ, Reisner D. Twin studies on genetic variations in resistance to tuberculosis. *J Hered*. 1943;34:269–76.
31. Ryan BM, Robles AI, Harris CC. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nat Rev Cancer*. 2010;10:389–402.
32. Skeels LE, Fleming JL, Mahler KL, Toland AE. The impact of 3'UTR variants on differential expression of candidate cancer susceptibility genes. *PLoS One*. 2013;8:e58609.
33. Ghanbari M, Franco OH, de Looper HWJ, Hofman A, Erkeland SJ, Dehghan A. Genetic variations in MicroRNA-binding sites affect MicroRNA-mediated regulation of several genes associated with cardio-metabolic phenotypes. *Circ Cardiovasc Genet*. 2015;8:473–486.
34. Kai Y, Qiang C, Xinpin P, Miaomiao Z, Kuailu L. Decreased miR-154 expression and its clinical significance in human colorectal cancer. *World J Surg Oncol*. 2015;13:195.
35. Lin X, Yang Z, Zhang P, Shao G. miR-154 suppresses non-small cell lung cancer growth in vitro and in vivo. *Oncol Rep*. 2015;33:3053–60.
36. Séguı B, Cuvillier O, Adam-Klages S, Garcia V, Malagarie-Cazenave S, Lévêque S, et al. Involvement of FAN in TNF-induced apoptosis. *J Clin Invest*. 2001;108(1):143–51.
37. Behar SM, Martin CJ, Booty MG, Nishimura T, Zhao X, Gan H-X, et al. Apoptosis is an innate defense function of macrophages against mycobacterium tuberculosis. *Mucosal Immunol*. 2011;4:279–87.
38. Chen M, Gan H, Remold HG. A mechanism of virulence: virulent mycobacterium tuberculosis strain H37Rv, but not attenuated H37Ra, causes significant mitochondrial inner membrane disruption in macrophages leading to necrosis. *J Immunol Baltim Md*. 2006;176:3707–16.
39. Chen Q, Gong B, Mahmoud-Ahmed AS, Zhou A, Hsi ED, Hussein M, et al. Apo2L/TRAIL and Bcl-2-related proteins regulate type I interferon-induced apoptosis in multiple myeloma. *Blood*. 2001;98(7):2183–92.
40. Peppelenbosch M, Boone E, Jones GE, van Deventer SJ, Haegeman G, Fiers W, et al. Multiple signal transduction pathways regulate TNF-induced actin reorganization in macrophages: inhibition of Cdc42-mediated filopodium formation by TNF. *J Immunol Baltim Md*. 1990;145:837–845.
41. Boeck A, Sieger D, Neacsu CD, Kashkar H, Krönke M. Factor associated with neutral Sphingomyelinase activity mediates navigational capacity of leukocytes responding to wounds and infection: live imaging studies in Zebrafish larvae. *J Immunol*. 2012;189(4):1559–66.
42. Grant AV, El Baghdadi J, Sabri A, El Azbaoui S, Alaoui-Tahiri K, Abderrahmani Rhoifi I, et al. Age-dependent association between pulmonary tuberculosis and common TOX variants in the 8q12-13 linkage region. *Am J Hum Genet*. 2013;92:407–14.
43. Neyrolles O, Quintana-Murci L. Sexual inequality in tuberculosis. *PLoS Med*. 2009;6 <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000199>.
44. Nhamoye-bonde S, Leslie A. Biological differences between the sexes and susceptibility to tuberculosis. *J Infect Dis*. 2014;209(Suppl 3):S100–6.
45. Bini EI, Mata Espinosa D, Marquina Castillo B, Barrios Payán J, Colucci D, Cruz AF, et al. The influence of sex steroid hormones in the immunopathology of experimental pulmonary tuberculosis. *PLoS One*. 2014;9:e93831.
46. D'Agostino P, Milano S, Barbera C, Di Bella G, La Rosa M, Ferlazzo V, et al. Sex hormones modulate inflammatory mediators produced by macrophages. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;876:426–9.
47. Zuckerman SH, Bryan-Poole N, Evans GF, Short L, Glasebrook AL. In vivo modulation of murine serum tumour necrosis factor and interleukin-6 levels during endotoxemia by oestrogen agonists and antagonists. *Immunology*. 1995;86(1):18–24.
48. Fox HS, Bond BL, Parslow TG. Estrogen regulates the IFN- γ promoter. *J Immunol*. 1991;146(12):4362–7.
49. Selma WB, Harizi H, Bougmiza I, Hannachi N, Kahla IB, Zaïeni R, et al. Interferon gamma +874T/a polymorphism is associated with susceptibility to active pulmonary tuberculosis development in Tunisian patients. *DNA Cell Biol*. 2011;30:379–87.
50. genomes browser. 2017. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/>. Accessed on 24 May 2017.

III.2 Association génétique entre le gène *CYP7A1* et la tuberculose

Article 2: The *CYP7A1* gene rs3808607 variant is associated with susceptibility of tuberculosis in Moroccan population

Mounia Qrafli, Youssef Amar, Jamaledine Bourkadi, Jouda Ben Amor, GhaliIraki, Youssef Bakri, Saaïd Amzazi, Ouafae Lahlou, Fouad Seghrouchni, Rajae El Aouad, Khalid Sadki.

Pan Afr Med J. 2014; 18:1 doi:10.11604/pamj.2014.18.1.3397

Le cholestérol et ses métabolites jouent un rôle primordial dans le fonctionnement du système immunitaire (Andersen, 2018; Dabrowski et al., 1980; Heiniger and Marshall, 1982; Tall and Yvan-Charvet, 2015). C'est un élément nécessaire au développement adéquat de la fonction cytotoxique (Bietz et al., 2017; Dabrowski et al., 1980). La majorité du cholestérol cellulaire se situe dans la membrane plasmique, en particulier dans les régions des radeaux lipidiques (LRs) riches en cholestérol et en sphingomyéline (Crane and Tamm, 2004). De plus, les LRs interviennent dans diverses voies de signalisation du système immunitaire. Il a été démontré que la stimulation des cellules T $\delta\gamma$ par des antigènes de *Mtb* induisait une agrégation des LRs suggérant leur contribution dans l'activation des cellules T $\delta\gamma$ (Lü et al., 2011). L'appauvrissement cellulaire en cholestérol perturbe la formation et la stabilité des radeaux, et engendre une suppression du TLR4 et du TCR, récepteur des lymphocytes T, en plus d'une induction de la signalisation pro-inflammatoire (Armstrong et al., 2010; Bensinger et al., 2008; Zhu et al., 2012, 2008).

Par ailleurs, il a été rapporté que le cholestérol de l'hôte est également impliqué dans l'infection et la persistance de *Mtb* (Soto-Ramirez et al., 2017; Miner et al., 2009; Pandey and Sassetti, 2008). Les taux de cholestérol de l'hôte ont été impliqués dans l'issue des infections à mycobactéries. Il a été démontré que les patients tuberculeux avaient un faible taux sérique de cholestérol, c'est pour cette raison que l'hypocholestérolémie a été proposée comme facteur de risque de TB (Pérez-Guzmán and Vargas, 2006). Le cholestérol a même été envisagé pour le traitement de la TB pulmonaire puisqu'un régime alimentaire riche en cholestérol a considérablement accéléré la stérilisation bactériologique des expectorations de patients atteints de TB pulmonaire (Andersen, 2018; Pérez-Guzmán et al., 2005).

L'homéostasie du cholestérol est régulée principalement par la voie du cholestérol 7- α -hydroxylase. Le gène *CYP7A1* code pour la protéine CYP7A1, qui est un cytochrome P450 catalysant l'étape principale et limitante de la régulation du métabolisme du cholestérol et des acides biliaires (Liu et al., 2016; Schwarz et al., 1998). Puisqu'une altération dans l'enzyme

CYP7A1 provoque une perturbation importante dans l'équilibre du cholestérol conduisant à un phénotype hypercholestérolémique (Pullinger et al., 2002).

Par ailleurs, le gène *CYP7A1* est situé dans une région chromosomique intéressante, la 8q12-q13, associée à la TB pulmonaire dans une population marocaine (Baghdadi et al., 2006).

Tous ces arguments ont fait du *CYP7A1* un gène candidat potentiel; Pour cette raison et dans le but d'investiguer l'éventuel lien qui pourrait exister entre ce gène et la prédisposition à la TB pulmonaire et pleurale nous avons conduit une étude cas-témoin comprenant 288 sujets. Nous avons réalisé un génotypage par la technique TaqMan® pour les variants génétiques suivants: rs8192875 et rs8192879 et par PCR-RFLP pour le SNP rs3808607.

En étudiant la distribution des fréquences génotypiques et alléliques chez les patients atteints de TB pulmonaire ou pleurale, par rapport aux témoins. Nous avons pu rapporter pour la première fois une association génétique entre l'allèle A du variant rs3808607 et la vulnérabilité à la TB. Il semble que les individus homozygotes AA ont environ deux fois le risque de développer une TB pulmonaire.

Nos données suggèrent que le gène *CYP7A1* pourrait jouer un rôle dans la susceptibilité à la TB.

Research

The CYP7A1 gene rs3808607 variant is associated with susceptibility of tuberculosis in Moroccan population

Mounia Qrafli^{1,2}, Youssef Amar², Jamaledine Bourkadi³, Jouda Ben Amor³, Ghali Iraki³, Youssef Bakri², Saaïd Amzazi², Ouafae Lahlou¹, Fouad Seghrouchni¹, Rajae El Aouad¹, Khalid Sadki^{2,*}

¹Laboratory of Human Genomic, National Institute of Hygiene, Rabat, Morocco, ²Laboratory of Biochemistry and Immunology, Faculty of Sciences, University Mohammed V, Rabat, Morocco, ³Department of Pneumophthisiology, Moulay Youssef Hospital, Rabat, Morocco.

*Corresponding author: Khalid Sadki, Laboratory of Biochemistry and Immunology, Faculty of Sciences, University Mohammed V-Agdal, Rabat, Morocco. 4, Avenue, Ibn battouta BP1014.

Key words: Tuberculosis, cholesterol 7-alpha-hydroxylase, polymorphisms, SNPs, cholesterol

Received: 19/09/2013 - Accepted: 22/04/2014 - Published: 01/05/2014

Abstract

Introduction: Despite the medical progress in treatment. Tuberculosis (TB) continues to be a serious global health problem. A genome-wide linkage study identified a major susceptibility locus on chromosomal region 8q12-q13 in Moroccan TB patients. The CYP7A1 gene is located in this region and codes for cholesterol 7 α -hydroxylase, an enzyme involved in cholesterol catabolism. **Methods:** We selected three SNPs (rs3808607, rs8192875 and rs8192879) and studied their genotype and allele frequencies distribution in patients with pulmonary (PTB) or pleural TB (pTB), and compared them to Healthy Controls (HC). Genotyping of rs8192875 and rs8192879 SNPs was carried out using the Taq Man SNP genotyping Assay while rs3808607 was investigated by PCR-RFLP. **Results:** We reported here for the first time a statistically significant increase in the AA homozygote genotype frequency of rs3808607 in PTB patients compared to HC ($p = 0.02$, OR = 1.93, 95% CI: 1.07;3.49). The increased risk of developing TB was maintained when we combined the groups of patients (PTB-pTB) ($p = 0.01$, OR= 1.91, 95% CI = (1.07 - 3.42). In contrast, no genetic association was observed between the rs8192875 or rs8192879 polymorphisms and TB. **Conclusion:** Our investigations suggest that rs3808607 may play a role in susceptibility to TB in a Moroccan population.

Pan African Medical Journal. 2014; 18:1 doi:10.11604/pamj.2014.18.1.3397

This article is available online at: <http://www.panafrican-med-journal.com/content/article/18/1/full/>

© Mounia Qrafli et al. The Pan African Medical Journal - ISSN 1937-8688. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

Tuberculosis (TB) is one of the oldest diseases to still affect the human race and is the cause of high mortality and morbidity worldwide. According to the seventeenth global report on TB published by the World Health Organization (WHO) the numbers of TB patients will increase in coming decades [1]. It has been estimated that one-third of the world's population is infected by *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). However, approximately only 10 % develop the disease, which suggests that TB is due to an as yet undefined risk factor.

Host cholesterol levels have been implicated in the outcome of mycobacterial infections. It has been found that TB patients have a low serum level of cholesterol so hypocholesterolemia was proposed as a risk factor for TB [2]. Cholesterol has been considered for treatment of pulmonary TB since a cholesterol-rich diet significantly accelerated the bacteriological sterilization of sputum of pulmonary tuberculosis patients [3]. Furthermore, it has been observed that the total serum cholesterol, HDL-C and LDL-C correlated with the evaluated radiological extent of the disease and the degree of smear positivity in pulmonary TB patients [4]. Likewise, molecular and biochemical analyses suggested that the development of the human TB granuloma to caseation correlated with pathogen-mediated dysregulation of host lipid metabolism [5]. Several studies have demonstrated the important role played by cholesterol in the function of the immune system [6,7]. Cholesterol is required for the adequate development of the cytotoxic function of human lymphocytes [6]; it participates in cytotoxic lymphocyte differentiation and proliferation [7]. Furthermore, lipid rafts (LR), plasma membrane microdomain enriched in cholesterol and sphingolipid, are involved in diverse signaling pathways of the immune system. It has been shown that $\delta\gamma$ T cells stimulation by *Mtb* antigens induces LR aggregation suggesting contribution of LR to $\delta\gamma$ T cells activation [8]. Importantly, in view of the toxicity associated with the accumulation in *Mtb* of some cholesterol metabolites such as cholest-4-en-3-one [9], it has been suggested that the cholesterol degradation pathway could be an interesting avenue for the development of new anti-tuberculosis agents [10]. It has been reported that host cholesterol is also involved in *Mtb* infection and persistence [11,12]. Moreover, several studies have reported the important role played by LR in the pathogenesis of *Mtb* infections [13]. So the implication of cholesterol in determining the fate of TB is still not completely understood. Nevertheless, there is a yet undefined link between TB and cholesterol. The homeostasis of cholesterol is regulated principally by the cholesterol 7- α -hydroxylase pathway. The *CYP7A1* gene codes for cholesterol 7- α -hydroxylase (CYP7A1), a cytochrome P450 that plays an essential role in maintaining a balance in cholesterol and bile acid since its catalytic reaction is the rate-limiting step and the major step in regulating homeostasis of cholesterol and bile acids [14]. The *CYP7A1* gene spans about 10 kb and contains 6 exons, 5 introns, one 5'-UTR, and one 3'-UTR and is localized on chromosome 8q12.1.

Genetic variations in the *CYP7A1* gene have been associated with metabolic disorders of cholesterol and bile acids, in addition to a risk of developing several diseases. In this context, it has been reported that a polymorphism in the promoter region of *CYP7A1* named -278 A>C (rs3808607), from the translation initiation codon, or -204 A>C from the transcriptional start site were found to be associated with hypercholesterolemia-hyperlipidemia [15-17], a risk of atherosclerosis [18], colorectal cancer [19] and hypertension [20]. In addition, a *CYP7A1* enzyme deficiency caused by a homozygous 1302-1303 delTT deletion mutation in *CYP7A1* exon 6, leading to a

frameshift (L413fsX414), has been linked to a hypercholesterolemic phenotype [16]. Importantly, *CYP7A1* gene is located within an interesting chromosomal region, the 8q12-q13 that is associated with pulmonary TB in a Moroccan population [21]. In the present study, we examined the polymorphism of three SNPs located in the *CYP7A1* gene and evaluated their impact on susceptibility to TB of a Moroccan population by using a case-control approach.

Methods

Study designs

Three hundred and twenty-four informed and unrelated adult volunteers were recruited for this immunogenetic study during two years, as of 2010. TB patients were represented by 136 PTB patients with sputum positive for acid-fast staining and mycobacterial culture and 50 pTB patients biopsy positive for granulomatous lesions and mycobacterial culture. All patients were tuberculin skin test positive. Patients were recruited from 19 public health centres, including the Centers of TB Treatment and Respiratory Disease (CTRD) and the university hospitals. Healthy controls (HC) included 138 subjects matched for sex and age and were recruited from the Regional Centers of Blood Transfusion (RCBT). All Moroccan ethnic groups (Arabs, Sahraoui and Berbers) are equally represented between Patients and healthy subjects.

All HC were tuberculin skin test negative and retained this immunological status during the two years after recruitment to a posterior telephonic check-contact. Ten ml of peripheral blood was collected in ethylenediaminetetraacetic acid tubes from all participants. Structured questionnaires were used to collect all information about demographic parameters and data on the medical history. The observed sex ratio (males/females) for TB patients was almost similar to that of HC (106/30 vs 105/33, respectively). The mean age $\pm$ standard deviation (SD) was 33.43 $\pm$ 13.24 years, ranging from 18 to 67 years, and 32.41 $\pm$ 11.10 years, ranging from 18 to 61 years, for patients and HC, respectively. All subjects were negatives for HIV-1/2 infection (tested by AxSYM Assays, Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA). This study was approved by the local ethics committee (Faculty of Medicine and Pharmacy from the Mohammed V-Souissi University) and informed written consent was obtained from all subjects.

CYP7A1 genotyping

DNA extraction: Total genomic DNA was extracted from peripheral blood of all TB patients and HC using QIAamp DNA Blood Maxi kit (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen GmbH, Hilden, Germany). DNA samples were stored at -20°C until use. CYP7A1 selected SNPs: Three functional SNPs of the CYP7A1 gene were selected for genotyping. When considering their position on the gene and the quality of the mutations we supposed that they could have a potential effect on the expression of the CYP7A1 enzyme: the first SNP rs8192875 C>T is located in the fourth exon and it represents a nonsense mutation. The second SNP rs8192879 C>T is in the 3'UTR region, in a linkage disequilibrium block (YRI-B1) [22]. The third SNP rs3808607 A>C is located in the promoter region.

Real time PCR genotyping: Two of the three selected SNPs were genotyped by Real time PCR technology for 136 PTB and 138 HC. In fact, rs8192875 and rs8192879 SNP genotyping was performed with a TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA). Reactions were performed as recommended by the manufacturer (Applied Biosystems), in a total

volume of 25 µl containing 1.25 µl of Drug metabolism genotyping assay 20 X, 12.5 µl of TaqMan 2 X Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) and 11.25 µl of DNA sample diluted in DNase-free water. Amplification was carried out for 50 cycles at 92°C for 15sec as a denaturation step, followed by an annealing/extension period at 60°C for 90 sec, with an initial denaturation period of 10 min at 95°C. PCR allelic discrimination was performed on a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), which measured the specific allele fluorescence of each sample.

PCR-RFLP Genotyping: The A-204C of the *CYP7A1* gene was genotyped in 100 PTB, 50 pTB and 100 HC. Genotyping was done by the PCR-BsaI restriction fragment length polymorphism method, using primers 5'-AATGTTTTTCCAGTTCTCTTC-3' (sense) and 5'-AATTAGCCATTTGTTTCATTCTATTAG-3' (antisense), as described previously (Wang et al., 1998). PCR primers were designed to amplify a product of 393 bp. Briefly, the PCR was performed in a reaction mixture of 10 µL containing 0.5 IU of Taq DNA polymerase and 1 µL of template DNA with a concentration of approximately 50–150 ng/µL. Preceded by the initial denaturation at 94°C for 4 min, the amplification was carried out for 30 cycles for 30 sec at 94°C, 30 sec at 53°C and 30 sec at 72°C, with a final extension at 72°C for 7 min. The PCR product of 393 bp was digested in a total volume of 20 µL with 10 IU of BsaI for 3 hr at 50°C. After enzymatic digestion two fragments of 93 bp and 300 bp for the A allele, and three fragments of 39 bp, 93 bp and 261 bp for the C allele were obtained. The digested products were visualized and photographed in 3% agarose gels stained with ethidium bromide. To validate the results obtained by PCR-RFLP, the genotyping of some randomly selected samples of each genotype profile were confirmed by DNA sequencing using an automated sequencing system (ABI Prism 3730 Genetic Analyzer), following the manufacturer's protocols.

Statistical analysis

The genotype frequencies and allele distribution between patients and HC were estimated by direct counting. The Hardy-Weinberg equilibrium was tested in the first step of statistical analysis. Statistical analysis was carried using EPI INFO software, version 7.1.0.6 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA; 08 September 2012). All results corresponding to p-values below 0.05 were considered statistically significant. Moreover, the odds ratio (OR) with a 95% confidence interval (CI) was calculated to evaluate the risk of association between genotypes or alleles and TB disease.

Results

All genotype frequencies of patients and HC were consistent with respect to the Hardy-Weinberg equilibrium. In fact, each χ^2 value calculated for each SNPs for both patient and HC groups are inferior to 3.84.

CYP7A1 promoter polymorphism and risk of TB

The genotype and allele frequency distribution of the *CYP7A1* -204 A>C polymorphism (rs3808607) between PTB and pTB patients and the HC groups are given in **Table 1**. A significant statistical difference in both the AA genotype and A allele frequencies have been observed between PTB patients and HC (43% vs 28 %, $p = 0.026$, OR = 1.94, 95% CI = 1.03–3.65 and 65% vs 54%, $p = 0.025$, OR = 1.58, 95% CI = 1.04–2.4, respectively). The same tendency in the AA genotype and allele frequencies distribution was found between pTB and HC, differences were not statistical reached (42% vs 28%, $p > 0.05$ and 64% vs 54%, $p > 0.05$, respectively).

Furthermore, We observed a significant increase of homozygote AA genotype and A allele frequencies in combined patient groups (PTB + pTB) compared with HC (43% vs 28 %, $p = 0.018$, OR = 1.91, 95% CI= 1.07–3.42 and 65 % vs 54 %, $p = 0.016$, OR = 1.56 (1.06–2.28), respectively).

rs8192879 CYP7A1 SNP genotyping

Statistical analysis of the rs8192879 polymorphism showed no significant difference in the genotype or allele frequency distribution for HC compared to PTB patients ($p > 0.05$) (**Table 2**). At allelic level, we observed a high frequency of C allele than T allele in both PTB patients and HC groups (75.72 % vs 24.28 % and 72.79% vs 27.21%, respectively).

rs8192875 CYP7A1 SNP genotyping

The results regarding the *CYP7A1* rs8192875 C>T SNP are shown in **Table 3**. No homozygous TT or heterozygous CT individuals were observed among neither the PTB patients nor the HC. There was no significant difference in the genotype and allele frequencies distribution between these two groups 100% vs 100% for AA genotype, $p > 0.05$).

However, there was no significant difference in the genotype and allele frequencies distributions for each SNP between Moroccan ethnic groups (p -value > 0.05) (data not shown).

Discussion

On the basis of numerous observations, evidence supports the hypothesis of contribution of host genetic factors in determining of susceptibility/resistance to TB [23, 24]. In this context, a previous reported studied genetic association in a Moroccan population with TB and suggested the potential involvement of some genes in the susceptibility or resistance to TB [25–27].

Here, using a candidate gene approach we investigated the association of three genetic variants in the *CYP7A1* gene with susceptibility to TB disease. To our knowledge the work presented here reported for the first time the relationship between *CYP7A1* gene polymorphism and susceptibility to TB. In fact, to reach this principal objective, we also report for the first time the genotype and allele frequencies distribution in a Moroccan population, which represents a North-African population. Comparison of the allele frequencies of all the SNPs investigated with those reported in HapMap database and in the literature revealed an interesting result: the mutant allele frequency seems to be different for each SNP between Caucasians, Chinese, Nigeria and Japanese populations. Hence, in our population the T allele of rs8192875 C>T could be considered as a rare allele as determined by its allele frequency. This result seems to be similar to that observed in Caucasians and Chinese populations (0 % and 1%, respectively) and little different to that reported in Nigerian and Japanese populations (2% and 6%, respectively). In addition, the T allele frequency of rs8192879 C>T SNP reported here (24.28%) was similar to that observed in Nigerian, Japanese and Chinese populations (22%, 26%, 27 %, respectively). In contrast, this allele frequency is lower than that reported in a Caucasian population (37%). The lack of association between the rs8192875 and rs8192879 polymorphisms and TB disease may indicate that these variations had no effect on conferring predisposition to TB in our population.

Interestingly, the C allele frequency of rs3808607 SNP found in our study is comparable to that reported in Chinese population (45.2 %)

[20], and it appears to be relatively higher than that reported in Caucasian (39 %) [17] and North Indian populations (39.8%) [28]. This allele may play a protective role since it is negatively associated with TB. Statistical analysis of our data report a significant positive association between the A allele and the AA homozygote genotype of the rs3808607 SNP and TB disease. It seems that AA genotype-carriers had almost a double risk of developing TB disease in our population. Furthermore, in the pTB patient group, the AA homozygote genotype was also found at a higher frequency compared to the HC (42% vs 28%), though this difference failed to reach statistical significance, suggesting a potential contribution of this specificity on susceptibility to pTB disease. The lack of association observed in this case could be attributed to the small size of the pTB patient group.

While we put together all the TB patients into the same group: PTB-pTB, the increase risk of developing TB was still sustained. These finding should be confirmed in a larger population. The genetic association revealed that the promoter region could play an important role in the control of the disease. Earlier studies reported that deletion of the -213 to 91 segment from the *CYP7A1* promoter caused a 40 % reduction in the promoter activity suggesting the location of an important regulatory element [29]. The location of this polymorphism in the promoter region could influence the interaction of transcription factors with their receptors on this region and consequently could modulate the transcriptional activity of this gene.

Based on the substantial and relevant data concerning on the one hand the function of cholesterol 7 α -hydroxylase in regulation of the balance in cholesterol and the crucial role played by cholesterol on the immune system [6, 7] and on the other hand the impact of genetic variations occurring at position -204 at the promoter region of the *CYP7A1* gene [16, 19], we can hypothesize on the development of TB disease in patients carrying an AA genotype of the rs3808607SNP. First of all, the AA genotype of *CYP7A1* was associated with an elevated low-density lipoprotein (LDL) cholesterol concentration in an Inuit Canadian population but not in Hutterites and Oji-Cree Canadian populations [30]. In addition, a significant increase in serum triglycerides in a healthy normolipidaemic male population and with significantly higher concentrations of total cholesterol in hypertriglyceridemic patients AA genotype carriers it was observed in a Netherlands population [17]. In contrast, others studies reported the opposite results, since the LDL-cholesterol concentrations were higher in CC than AA homozygotes both men and women [15]. Differences in the genetic background of the populations may be among the reasons for these discrepancies. Furthermore, the AA genotype was associated with other diseases such as hypertension in obese male patients [20]. De Castro-Ors and colleagues suggested that compared with the A-allele, the C-allele variation was associated with enhanced gene expression [31]. According to this observation we could suppose that the AA genotype is associated with decreased gene expression. The -204A allele may participate in the repression of gene expression by increasing the affinity to negative regulators or in an opposite manner by decreasing the affinity to one or more positive regulators acting on the promoter region of the *CYP7A1* gene, which is linked the cholesterol metabolism to immune system. This hypothesis is supported by Lu and his colleagues from studies into liver X receptors (LXRs) [32]. LXRs are nuclear receptors that play a central role in the transcriptional control of cholesterol homeostasis. They comprise two members LXRA and LXR β . LXRs are also important for the proper control of genes involved in the innate immune response to bacterial pathogens and mice lacking LXRs were more susceptible to *Mtb* infection [33].

Interestingly, in a murine model, it has been reported that LXRA stimulates the expression of *CYP7A1* via binding to a potent LXR response element (LXRE) present in the *CYP7A1* promoter [34]. Additionally, it has been shown that LXRA with LXR-1 can act as a positive gene expression regulator of *CYP7A1* in mice [32]. So, we can hypothesize that any genetic variation occurring in this region of the *CYP7A1* promoter (LXRE) could theoretically influence *CYP7A1* gene expression. The *CYP7A1* will be repressed and consequently the cholesterol will be more available to pathogens. As cholesterol is required by *Mtb* for infection and persistence, it acts as a virulence factor [11, 12]. So, it seems that the AA homozygous subjects were more susceptible to develop TB disease.

Finally, we cannot exclude the possibility that the -204 A allele is in linkage disequilibrium with a yet unidentified functional polymorphism at the *CYP7A1* gene itself or other closely located genes directly or indirectly related to immune system pathways implicated in defense against TB. More recently, Grant and colleagues have identified a statistically significant association between two genetic variants (rs2726600 and rs1568952), located within the TOX gene and PTB disease in a Moroccan population [35]. The *CYP7A1* gene is located close to the TOX gene and it would be interesting to do a statistical haplotype analysis to evaluate the risk of each variant on the susceptibility in the Moroccan population.

Conclusion

In summary, we identified for the first time a significant association of the A-204C polymorphism of the *CYP7A1* gene and development of TB in a Moroccan population. This finding should be confirmed on a larger sample size. In addition, further studies should give a better understanding of the involvement of *CYP7A1* in terms of the susceptibility to TB.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interest.

Authors' contributions

All authors contributed to the conduct of the research and writing of this manuscript. Authors reviewed and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgments

The current study was supported by research grants from the Hassan II Academy of Science and Technology, Kingdom of Morocco. We would like to thank all patients and HC for their participation. We are sincerely grateful to the clinicians and nurses of the different prefectures (Marrakech, Rabat, Temara, Fes, Oujda, Tanger and Casablanca) for their contribution to the clinical examinations. All authors declare no conflict of interest concerning the submission of this manuscript.

Tables

Table 1: Genotypes and alleles frequencies for the rs3808607CYP7A1 polymorphism in TB (TBP, pTB) patients vs HC

Table 2: Genotypes and alleles frequencies for the rs8192879 CYP7A1 polymorphism in PTB patients and HC

Table 3: Genotypes and alleles frequencies for the rs8192875 CYP7A1 polymorphism in PTB patients and HC

References

- World Health Organization. Global tuberculosis report. 2012. http://who.int/tb/publications/global_report/gtbr12_main.pdf. Accessed 30 April 2014.
- Pérez-Guzmán C, Vargas MH. Hypocholesterolemia: a major risk factor for developing pulmonary TB. *Med Hypotheses*. 2006; 66(6):1227–1230. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
- Pérez-Guzmán C, Vargas MH, Quiñonez F, Bazavilvazo N, Aguilar A. A cholesterol-rich diet accelerates bacteriologic sterilization in pulmonary TB. *Chest*. 2005; 127(2):643–651. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
- Deniz O, Gumus S, Yaman H, Ciftci F, Ors F, Cakir E, Tozkoparan E, Bilgic H, Ekiz K. Serum total cholesterol, HDL-C and LDL-C concentrations significantly correlate with the radiological extent of disease and the degree of smear positivity in patients with pulmonary TB. *Clin Biochem*. 2007; 40(3-4):162–166. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
- Kim MJ, Wainwright HC, Lockett M, Bekker LG, Walther G, et al. Caseation of Human TB Granulomas Correlates with Elevated Host Lipid Metabolism. *EMBO Mol Med*. 2010; 2(7):258–274. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
- Drabowsky MP, Peel WE, Thomson AER. Plasma membrane cholesterol regulates human lymphocyte cytotoxic function. *Eur J Immunol*. 1980; 10(11):821–827. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
- Heiniger HJ, Marshall JD. Cholesterol synthesis in polyclonally activated cytotoxic lymphocytes and its requirements for differentiation and proliferation. *Proc Natl Acad Sci*. 1982; 79(12):3823–3827. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
- Lü HZ, Zhu AY, Chen Y, Tang J, Li BQ. Formation and aggregation of lipid rafts in $\delta\gamma$ T cells following stimulation with *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *J Exp Med*. 2011; 233(3):193–198. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
- Ouellet H, Guan S, Johnston JB, Chow ED, Kells PM, et al. *Mycobacterium tuberculosis* CYP125A1, a steroid C27 monooxygenase that detoxifies intracellularly generated cholest-4-en-3-one. *Mol Microbiol*. 2010; 77(3):730–742. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
- Ouellet H, Johnston JB, Ortiz de Montellano PR. Cholesterol catabolism as a therapeutic target in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol*. 2011; 19(11):530–539. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
- Pandey AK, Sasseti CM. Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. *Proc Natl Acad Sci*. 2008; 105(11) 4376–4380. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
- Miner MD, Chang JC, Pandey AK, Sasseti CM, Sherman DR. Role of cholesterol in *Mycobacterium TB* infection. *Indian J Exp Biol*. 2009; 47(6):407–411. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
- Muñoz S, Rivas-Santiago B, Enciso JA. *Mycobacterium tuberculosis* entry into mast cells through cholesterol-rich membrane microdomains. *Scand J Immunol*. 2009; 70(3):256–263. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
- Schwarz M, Lund EG, Russell DW. Two 7 α -hydroxylase enzymes in bile acid biosynthesis. *Curr Opin Lipidol*. 1998; 9(2):113–118. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
- Wang J, Freeman DJ, Grundy SM, Levine DM, Guerra R, Cohen JC. Linkage between cholesterol 7 α -hydroxylase and high plasma low-density lipoprotein cholesterol concentrations. *J Clin Invest*. 1998; 101(6):1283–1291. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
- Pullinger CR, Eng C, Salen G, Shefer S, Batta AK, Erickson SK, et al. Human cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype. *J Clin Invest*. 2002; 110(1):109–117. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
- Hofman MK, Groenendijk M, Verkuiljen PJH, Jonkers IJ, et al. Modulating effect of the A278C promoter polymorphism in the cholesterol 7 α -hydroxylase gene on serum lipid levels in normolipidaemic and hypertriglyceridaemic individuals. *Eur J Hum Genet*. 2004; 12(11):935–941. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
- Lambrinoudaki IV, Kaparos GI, Vlachou SA, Stamatelopoulou KS, Georgiopoulos GA, Sergentanis TN, Panoulis CP, Christodoulakos GE, Alexandrou AP, Kouskouni EE, Creatsa MG, Papamichael CM. CYP A-204C polymorphism is associated with subclinical atherosclerosis in postmenopausal women. *Menopause*. 2008; 15(6):1163–1168. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
- Hagiwara T, Kono S, Yin G, Toyomura K, Nagano J, et al. Genetic Polymorphism in Cytochrome P450 7A1 and Risk of Colorectal Cancer: The Fukuoka Colorectal Cancer Study. *Cancer Res*. 2005; 65(7):2979–2982. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
- Fu L, Zhao Y, Wu X, Liu H, Shi J, Lu J, Zhou B. CYP7A1 genotypes and haplotypes associated with hypertension in an obese Han Chinese population. *Hypertens Res*. 2011; 34 (6): 722–727. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
- El Baghdadi J, Orlova M, Alter A, Ranque B, Chentoui M, et al. An autosomal dominant major gene confers predisposition to pulmonary TB in adults. *J Exp Med*. 2006; 203(7):1679–1684. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
- Nakamoto K, Wang S, Jenison RD, Guo GL, Klaassen CD, YvonneWan YJ, Zhong X. Linkage disequilibrium blocks, haplotype structure, and hSNPs of human CYP7A1 gene. *BMC Genet*. 2006; 7:29. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
- Kallmann FJ, Reisner D. Twin studies on the significance of genetic factors in tuberculosis. *Am Rev Tuberc*. 1943; 47:549–574. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)

24. Yim JJ, Selvaraj P. Genetic susceptibility in tuberculosis. *Respirology*. 2010; 15(2):241-256. **PubMed** | **Google Scholar**
25. Lamsyah H, Rueda B, Baassi L, Elaouad R, Bottini N, Sadki K, Martin J. Association of PTPN22 gene functional variants with development of pulmonary tuberculosis in Moroccan population. *Tissue Antigens*. 2009; 74(3):228–232. **PubMed** | **Google Scholar**
26. Sadki K, Lamsyah H, Rueda B, Akil E, Sadak A, Martin J, El Aouad R. Analysis of MIF, FCGR2A and FCGR3A gene polymorphisms with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Moroccan population. *J Genet Genomics*. 2010; 37(4):257–264. **PubMed** | **Google Scholar**
27. Arji N, Busson M, Iraqi G, Bourkadi JE, Benjouad A, Boukouaci W, et al. The MCP-1 (CCL2) -2518 GG genotype is associated with protection against pulmonary tuberculosis in Moroccan patients. *J Infect Dev Ctries*. 2012; 6(1):73-78. **PubMed** | **Google Scholar**
28. Srivastava A, Choudhuri G, Mittal B. CYP7A1 (-204 A>C; rs3808607 and -469 T>C; rs3824260) promoter polymorphisms and risk of gallbladder cancer in North Indian population. *Metabolism*. 2010; 59(6):767–773. **PubMed** | **Google Scholar**
29. Cooper AD, Chen J, Botelho-Yetkinler MJ, Cao Y, Taniguchi T, Levy-Wilson B. Characterization of hepatic-specific regulatory elements in the promoter region of the human cholesterol 7 α -hydroxylase gene. *J Biol Chem*. 1997; 272(6):3444–3452. **PubMed** | **Google Scholar**
30. Hegele RA, Wang J, Harris SB, Brunt JH, Young TK, et al. Variable association between genetic variation in the CYP7 gene promoter and plasma lipoproteins in three Canadian populations. *Atherosclerosis*. 2001; 154(3):579–587. **PubMed** | **Google Scholar**
31. De Castros-Orós I, Pampin S, Cofán M, Mozas P, et al. Promoter variant - 204A > C of the cholesterol 7 α -hydroxylase gene: Association with response to plant sterols in humans and increased transcriptional activity in transfected HepG2 cells. *Clin Nutr*. 2011; 30(2):239-246. **PubMed** | **Google Scholar**
32. Lu TT, Makishima M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA, Auwerx J, Mangelsdorf DJ. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell*. 2000; 6(3):507-515. **PubMed** | **Google Scholar**
33. Korf H, Beken SV, Romano M, Steffensen KR, Stijlemans B, et al. Liver X receptors contribute to the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *J Clin Invest*. 2009; 119(6):1626 –1637. **PubMed** | **Google Scholar**
34. Zhao C, Dahlman-Wright K. Liver X receptor in cholesterol metabolism. *J Endocrinol*. 2010; 204(3):233–240. **PubMed** | **Google Scholar**
35. Grant AV, El Baghdadi J, Sabri A, El Azbaoui S, Alaoui-Tahiri K, Rhorfi IA, et al. Age-Dependent Association between Pulmonary Tuberculosis and Common TOX Variants in the 8q12–13 Linkage Region. *American J of Hum Genet*. 2013; 92(3):407–414. **PubMed** | **Google Scholar**

Table 1: Genotypes and alleles frequencies for the rs3808607 *CYP7A1* polymorphism in TB (TBP, pTB) patients vs HC

Patients vs Controls						
rs3808607	PTB N= 100 (%)	pTB N=50 (%)	PTB-pTB N=150 (%)	HC N=100 (%)	P value	OR (95% CI)
Genotypes (N)						
AA	43(43)	21 (42)	64 (43)	28(28)	0,026 ^a	1,94 [1,03-3,65] ^a
					>0,05 ^b , 0.018 ^c	1,91 [1,07-3,42] ^c
AC	44 (44)	22 (44)	66 (44)	52 (52)	>0,05 ^{a,b,c}	
CC	13 (13)	7 (14)		20 (20)	> 0,05 ^{a,b,c}	
Alleles (2N)						
A	130 (65)	64 (64)	194 (65)	108 (54)	0,025 ^a	1,58 [1,04-2,41] ^a
					>0,05 ^b , 0.016 ^c	1,56 [1,06-2,28] ^c
C	70 (35)	36 (36)	106 (35)	92 (46)	0,025 ^a	0,63 [0,41-0,96] ^a
					>0,05 ^b , 0.016 ^c	0,64 [0,44-0,94] ^c

Abbreviations : CI= confidence interval; OR = odds ratio ; ^a : PTB vs HC ; ^b : pTB vs HC; ^c : PTB-pTB vs HC.

Table 2: Genotypes and alleles frequencies for the rs8192879 <i>CYP7A1</i> polymorphism in PTB patients and HC			
PTB vs HC			
rs8192879	PTB N= 136 (%)	HC N= 138 (%)	P value
Genotypes (N)			
CC	69 (50,73)	82 (59,42)	>0,05
CT	60 (44,11)	45 (32,6)	>0,05
TT	7 (5,14)	11 (7,97)	>0,05
Alleles (2N)			
C	198(72,79)	209(75,72)	>0,05
T	74(27,21)	67 (24,28)	>0,05
Abbreviations: PTB = pulmonary tuberculosis; HC = Healthy controls			

Table 3: Genotypes and alleles frequencies for the rs8192875 <i>CYP7A1</i> polymorphism in PTB patients and HC			
PTB vs HC			
rs8192875	PTB N = 136 (%)	HC N = 138 (%)	P value
Genotypes (N)			
CC	136 (100)	138(100)	>0,05
CT	0 (0)	0 (0)	>0,05
TT	0 (0)	0 (0)	>0,05
Alleles (2N)			
C	272 (100)	276 (100)	>0,05
T	0 (0)	0 (0)	>0,05
Abbreviations: PTB = pulmonary tuberculosis; HC = Healthy controls			

III.3 Validation des résultats obtenus par la PCR-RFLP

Dans le but de valider nos résultats de la PCR-RFLP qui ont associé pour la première fois le rs3808607 au développement de la TB et afin de vérifier la position de cet SNP investigué, nous avons réalisé un séquençage de 10 patients tuberculeux choisis aléatoirement parmi ceux investigués par PCR-RFLP; huit d'entre eux sont atteints de TB pulmonaires et deux ont une TB pleurale.

L'analyse de nos données a montré que les résultats de génotypage par PCR-RFLP concordent à 100 % avec ceux obtenus par le séquençage, considérée comme la technique de référence (figure 26). Ce qui confirme la fidélité de la PCR-RFLP et de la démarche technique suivie.

Nous avons aussi pu confirmer la localisation du rs3808607 à la position 58500365 comme décrit dans la littérature (<https://www.snpedia.com/index.php/Rs3808607>) dans le promoteur du gène *CYP7A1* (figure 27). Il est aussi intéressant de savoir que ce SNP est localisé dans un DHS (site d'hypersensibilité de DNase I) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/110596866>). Cette localisation est stratégique plaçant le rs3808607

- ✓ À 53pb du site Bare II [58500285-58500312], abritant le site II de liaison de PPAR α /RXR α .
- ✓ À 57pb du site Bare II [58500287-58500308], où on trouve le récepteur de la vitamine D et de l'acide 9-cis rétinoïque (vitamine A) (VDR/ RXR α).
- ✓ À 132 plus loin du site Bare I [58500216-58500233], contenant un 2^{ème} récepteur VDR/ RXR α .

Par ailleurs, nos résultats nous ont permis d'identifier trois nouvelles mutations potentielles:

- La première mutation (NC_000008.11: g. 58500624 C>T), a provoqué une substitution de l'allèle sauvage C par l'allèle mutant T localisée à 58500624 (figure 28).
- La 2^{ème} mutation (NC_000008.11: g. 58500624 del T) à la même position (58500624) nous avons identifié également, une délétion d'une seule base T.
- La 3^{ème} mutation (NC_000008.11: g. 58500260 G>A), a provoqué une substitution de l'allèle sauvage G par l'allèle mutant A, localisée à 58500260 (figure 29).

Quant à la distribution de la fréquence des mutations par patients, nous avons observé que 60 % des patients (6/10), étaient porteurs de la nouvelle mutation (NC_000008.11: g. 58500624 C>T). A la même position de cette substitution, 20 % (2/10) des patients étaient porteurs d'une délétion (NC_000008.11: g. 58500624 del T) (figure 30). Alors que la mutation (NC_000008.11: g. 58500260 G>A), n'a été observée que chez 10 % des patients (1/10) (figure 29 et 31).

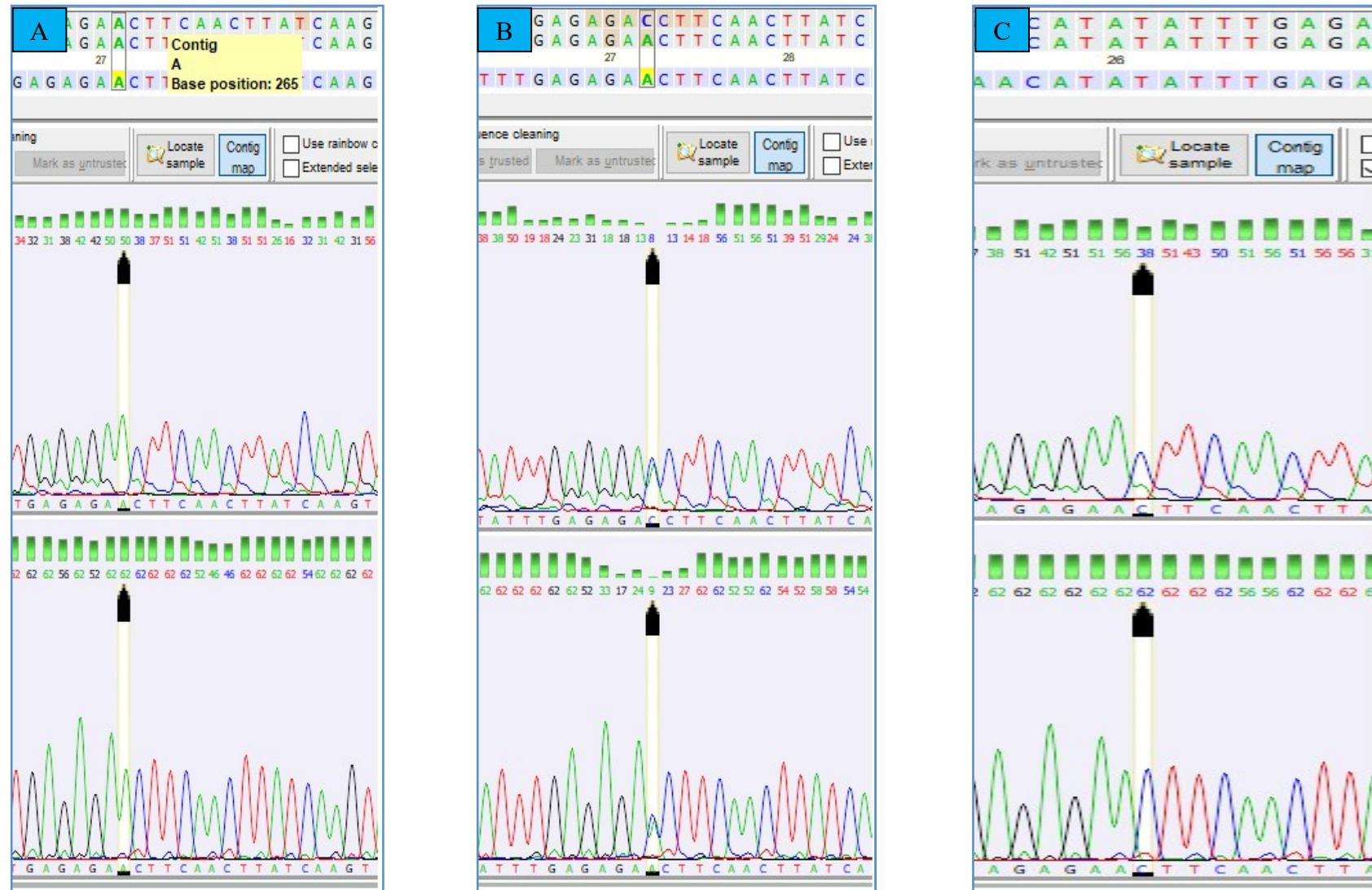


Figure 26 | Exemple de génotypage du rs3808607 par séquençage confirmant les résultats du PCR-RFLP, (A) du patient P124F de génotype AA ; (B) ; du patient P125O de génotype AC; (C) du patient P107F de génotype CC. Les résultats sont analysés en utilisant le logiciel DNA Baser Assembler v 5.15, Heracle BioSoft.

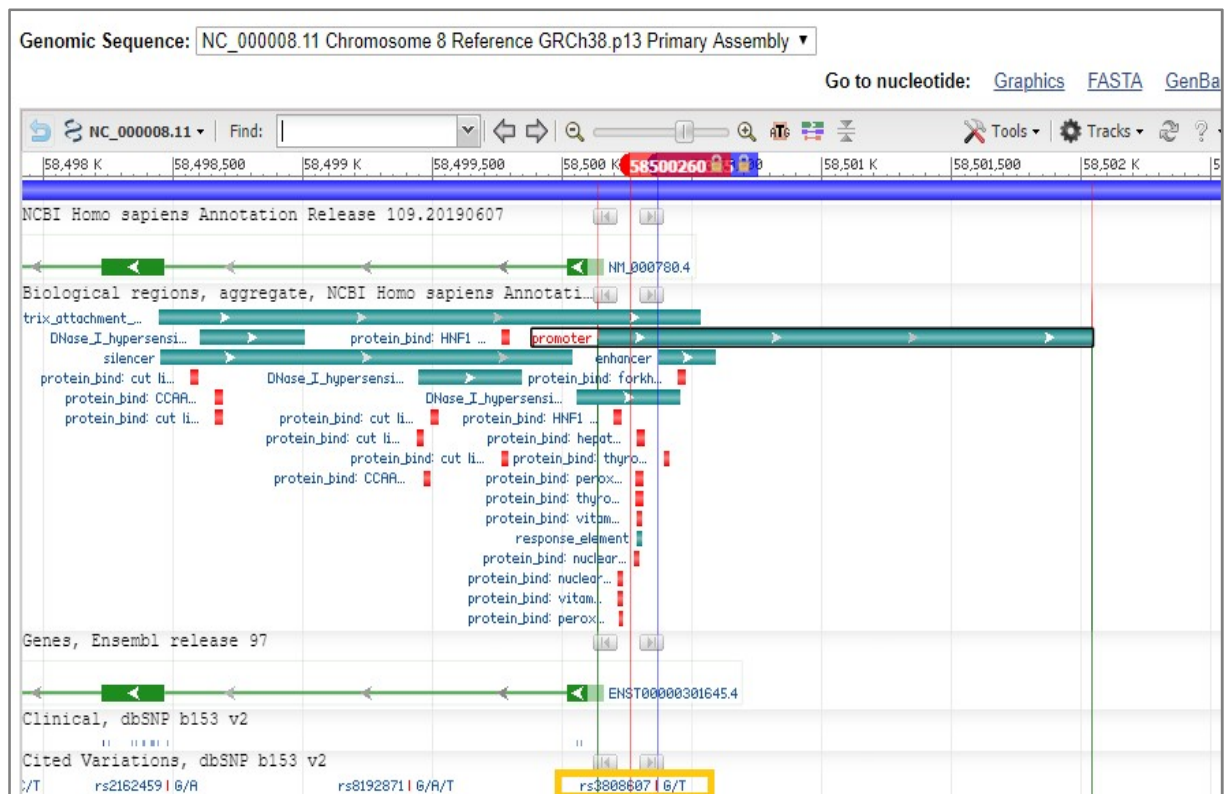


Figure 29 | Localisation de la mutation (NC_000008.11: g. 58500260 G>A) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/110596866>)

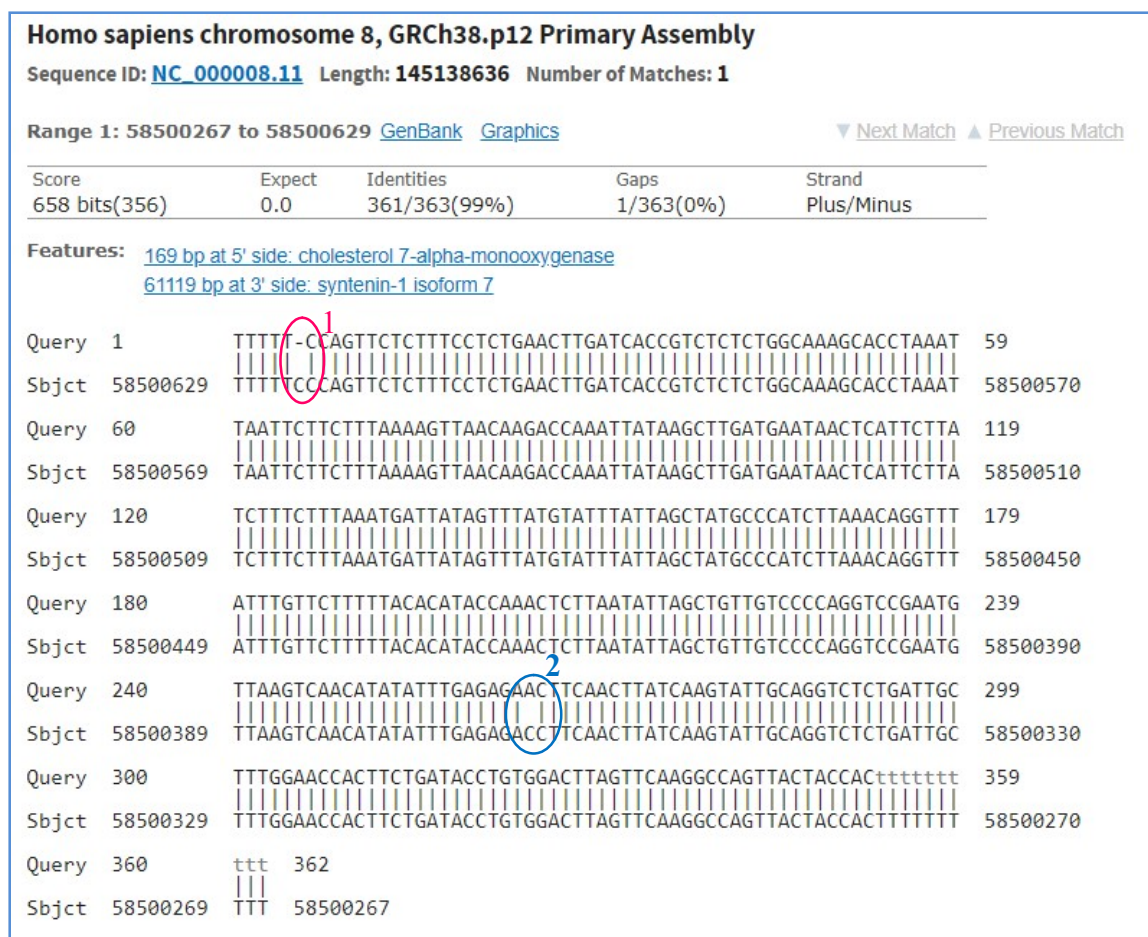


Figure 30 | Résultat d'alignement d'une séquence du promoteur du gène *CYP7A1* par rapport à la séquence de référence. Ce résultat montre que ce patient est porteur de (1) la mutation (NC_000008.11: g. 58500624 delT) et de (2), la mutation rs3808607.

Légende:

- Query: Séquence contig du patient P28F
- Sbjct: Séquence de référence

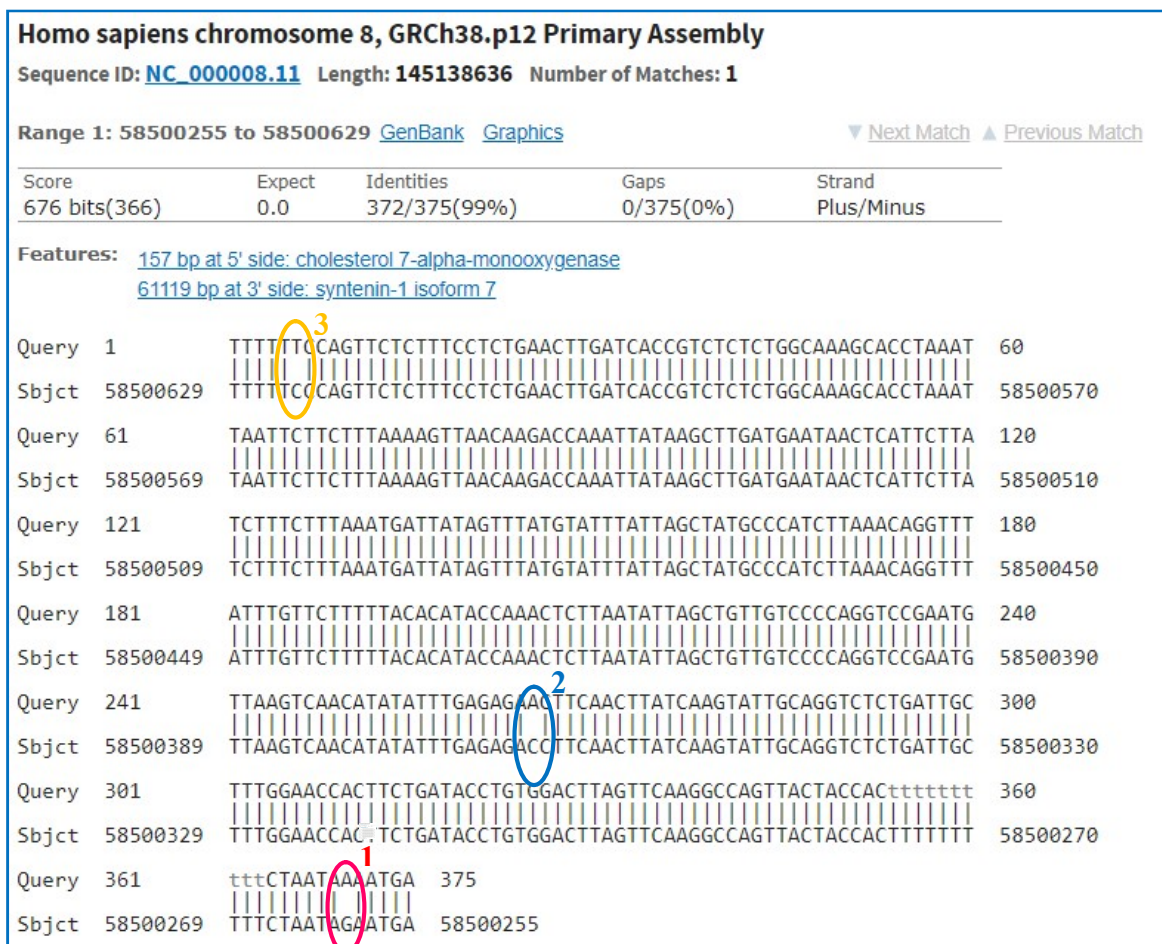


Figure 31 | Résultat d'alignement d'une séquence du promoteur du gène *CYP7A1* par rapport à la séquence de référence. Ce résultat montre que ce patient est porteur de: **1**, la mutation (NC_000008.11: g. 58500260 G>A); **2**, la mutation rs3808607 ; **3**, la mutation (NC_000008.11: g. 58500624 C>T).

Légende:

- Query: Séquence contig du patient P37F
- Sbjct: Séquence de référence

III.4 Association de la tuberculose avec la faible concentration de la vitamine A

Article 3: Low plasma vitamin A concentration is associated with tuberculosis in Moroccan population: a preliminary case control study

Mounia Qrafli, Khalid El Kari, Hassan Aguenau, Jamal Eddine Bourkadi, Khalid Sadki and Mohammed El Mzibri.

BMC Res Notes (2017) 10:421 DOI 10.1186/s13104-017-2737-z

Il est maintenant bien établi que les carences nutritionnelles sont associées à une altération des fonctions immunitaires. L'état nutritionnel est l'un des plus importants déterminants de la résistance aux infections. Il a été démontré que plusieurs vitamines, dont la vitamine A, jouent un rôle dans l'immunité contre l'infection ou la maladie à *Mtb* (Aibana et al., 2018, 2017; Gupta et al., 2009). En effet, la vitamine A est essentielle pour l'accomplissement de plusieurs fonctions physiologiques, comme la vision, la croissance et la reproduction (Tanumihardjo, 2011). Elle joue notamment un rôle important dans les réponses immunitaires contre les agents pathogènes tels que le *Mtb* (Aibana et al., 2017; Guo et al., 2015; Raverdeau and Mills, 2014).

Hall et ses collègues ont rapporté qu'après l'infection de souris déficientes en vitamine A par *T. gondii*, les réponses immunitaires Th1 et Th17 étaient altérées et de faible niveau d'IFN- γ et IL17 ont été observés (Hall et al., 2011). De plus, il a été rapporté que les actions synergiques de la vitamine A (acide rétinoïque AR) et de la vitamine D sont capables de réprimer la transcription du gène *TACO* permettant aux mycobactéries de survivre dans les macrophages humain (Anand et al., 2008; Ferrari et al., 1999; Gogulamudi et al., 2015). En outre, lorsque les macrophages THP-1 sont incubés à l'acide chénodésoxycholique (un acide biliaire primaire) et l'AR, l'entrée et la survie intracellulaire du *Mtb* sont considérablement restreintes (Anand and Kaul, 2005). Aussi, l'administration orale de l'AR chez les rats diminue le nombre de *Mtb* par rapport aux témoins (Yamada et al., 2007). Par ailleurs, une découverte intéressante a révélé que la vitamine A collabore avec le NPC2 (Niemann-Pick disease type C2) pour assurer une activité antimicrobienne induite par une réduction de la concentration du cholestérol cellulaire (Wheelwright et al., 2014).

Le développement de la TB dépend étroitement du statut immunologique des hôtes, nécessitant la présence de micronutriments, notamment le fer, le zinc, les vitamines A et D, pour un fonctionnement adéquat (Aibana et al., 2017; Chandra, 1997; Katona and Katona-Apte, 2008).

Une prévalence élevée de la carence en vitamine A a été observée chez les patients atteints de TB, suggérant une forte association entre une carence en vitamine A et le développement de la TB (Aibana et al., 2017; Karyadi et al., 2000; Ramachandran et al., 2004; Wiid et al., 2004).

Ainsi, nous avons réalisé une étude préliminaire pour évaluer les concentrations de vitamine A chez les patients marocains atteints de TB, en vue d'entreprendre une étude plus large sur l'efficacité de la supplémentation en vitamine A chez les patients tuberculeux. La concentration plasmatique de rétinol a été mesurée par HPLC chez 44 patients tuberculeux récemment diagnostiqués et 40 témoins sains. Nous avons montré que la vitamine A plasmatique est significativement plus basse chez les patients tuberculeux que chez les témoins sains ($p < 0,0001$).

Notre étude a montré une association entre les faibles taux de vitamine A et la TB.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Low plasma vitamin A concentration is associated with tuberculosis in Moroccan population: a preliminary case control study

Mounia Orafi^{1,2}, Khalid El Kari¹, Hassan Aguenau¹, Jamal Eddine Bourkadi³, Khalid Sadki² and Mohammed El Mzibri^{1*}

Abstract

Background: Vitamin A plays numerous roles in immune system. Its deficiency alters both the innate and adaptive immunity. Previous results reported that the micronutrients deficiency, particularly vitamin A, is observed in patients with tuberculosis. Thus, we aimed in this study to assess vitamin A concentrations in Moroccan patients with tuberculosis to set up a large efficacy study of vitamin A supplementation for TB infected patients. Plasma retinol concentration was measured by HPLC in 44 recently diagnosed TB patients and 40 healthy controls.

Results: We showed that plasma vitamin A is significantly lower in tuberculosis patients as compared to healthy controls ($p < 0.0001$). Moreover, no significant association was found between vitamin A deficiency and TB severity and patients' ages.

Conclusion: Our study confirms the association between low vitamin A levels and tuberculosis disease.

Keywords: Tuberculosis, Vitamin A, Plasma, Deficiency, Morocco

Background

Tuberculosis, an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) is still a health problem causing human mortality worldwide. According to the World Health Organization (WHO) report, One-third of the world's population is reportedly infected with MTB and 9.6 million new tuberculosis (TB) cases and about 1.5 million deaths were reported this year [1]. An overwhelming majority of TB patients reside in the developing countries, which suffer from marked poverty, lack of healthy living conditions, and inadequate medical facilities [2]. TB development is closely dependent on the immunological status of the hosts, requiring the presence of micronutrients including iron, zinc, vitamins A and D for adequate functioning [3, 4]. Vitamin A has a pivotal role in immune responses and accordingly is essential in the host defense against pathogens as MTB [5, 6].

Hall and his colleagues have reported that Th1 and Th17 immune responses are impaired in the absence of vitamin A metabolites as demonstrated by the observation of the low level of IFN- γ and IL17 cytokines production after infection of vitamin A deficient mice with *T. gondii* [7]. Indeed, the authors of this study have also demonstrated that RA restores the level of these cytokines production and therefore influences significantly the CD4 T cells protective immunity [7].

More recently, RA signaling was shown to confer Th1 cell stability and to restrain their conversion to Th17 cells [8]. In addition, it has been reported that tryptophan-aspartate containing coat protein (TACO) gene plays a crucial role allowing mycobacteria to survive within macrophages while synergistic actions of retinoic acid (RA) and vitamin D are able to down-regulate TACO transcription in human macrophages allowing delivery of Mycobacteria to lysosomes [9–11]. Furthermore, when THP-1 macrophages are exposed to chenodeoxycholic acid/RA, the entry and intracellular survival of MTB are significantly restricted [12]. Moreover, oral

*Correspondence: mzibri@yahoo.com

¹ Unité Mixte de Recherche Nutrition et Alimentation, (CNESTEN–Université Ibn Tofail), CNESTEN BP 1382 RP, 10001 Rabat, Morocco
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2017. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

administration of RA decreases the number of colony-forming units (CFU) of *MTB* in RA-treated rats compared with controls [13].

More recently, an interesting finding revealed that expression of *NPC2* and vitamin A-mediated antimicrobial activity against *MTB* triggered a reduction in the total cellular cholesterol concentration [14].

Conversely, vitamin A deficiency (VAD) is associated with alterations in ocular tract including squamous metaplasia of the conjunctiva and cornea, in addition to keratinization and loss of cilia in the respiratory tract. Moreover, VAD is also linked to a loss of microvilli from gastrointestinal tract and a decrease in goblet cells and mucin production of genitourinary tract [15–20]. It has also been reported that VAD disrupts normal neutrophil and macrophage development and can result in impaired ability to ingest and kill bacteria [21, 22]. A high prevalence of (VAD) has been observed in patients with pulmonary tuberculosis, suggesting a strong association between vitamin A deficiency and TB development [23–25].

In Morocco, TB is considered as a major problem of the public health with a high incidence reaching, in 2014, 82 new cases for 100,000 inhabitants. Tuberculosis affects especially young adults and therefore has a high impact on the socio-economic status of the country. To fight against TB, the ministry of health has set up a national tuberculosis program focusing its interest on rapid diagnosis and adequate management of TB patients [26]. However, the national program is faced by many factors including the virulence of the bacteria, resistance to available anti-tuberculosis drugs, adherence to the treatment and the presence of malnutrition, especially micronutrients deficiency which has a dramatic impact on the immune status of patients. Therefore, modulation of the immune system of TB patients, through vitamin A supplementation, could be of a great interest to increase the rate of sputum conversion, enhance the wellbeing of TB patients and consequently help the program to fight against TB. Evaluation of vitamin A status of TB patients is primordial prior to the implementation of a nutritional strategy based on vitamin A supplementation of TB patients for better management of TB in Morocco. Thus, the present study was planned to evaluate plasma retinol concentrations in Moroccan newly diagnosed pulmonary TB patients compared to healthy controls.

Methods

Subjects and study design

The present study was conducted on 84 participants; 44 TB patients and 40 healthy controls. TB patients were recruited from Moulay Youssef hospital in Rabat, specialized in TB diagnosis and treatment. To be included in

the study, patients have to be new TB cases and should be sputum-smear and/or culture positive. According to guidelines of the National tuberculosis program, the disease is considered as severe when it takes the form of miliary TB, multifocal TB, extended tuberculosis bronchopneumonia and in case of confection TB/HIV.

Healthy controls group was recruited from the Regional Center of Blood Transfusion of Rabat and all of them are tuberculin skin test negative. All TB patients and healthy controls recruited in this study were HIV seronegative. HIV testing was done using rapid test (Determine™ HIV-1/2 antibody test). At recruitment, each participant was assessed, using questionnaires including age, sex and medical history. Blood samples were obtained from all eligible subjects, both patients and controls, for plasma retinol evaluation.

Blood collection

Approximately, 5 mL of the whole blood was taken by venipuncture into 5 mL vacutainers (Greiner Bio-One, Germany) containing EDTA. To avoid direct exposition to light, specimens were transported in cryoboxes. Plasma was separated after centrifugation of blood at 750g for 10 min at room temperature, and then stored at -80°C until analysis.

Plasma retinol analysis

Plasma retinol concentration was measured by HPLC (High Performance Liquid Chromatography) as previously described [27]. Briefly, 0.5 mL of serum was mixed with 0.5 mL of ethanol containing internal standard (retinyl acetate), vortexed and extracted twice with 2 mL of methylene chloride-hexane (1:5). Organic phases were pooled, evaporated to dryness and reconstituted to be injected onto the HPLC (20 μL). The retinol was measured using a Spheri-5-ODS column (Applied Biosystems, San Jose, CA) with mobile phase of acetonitrile-methanol (85:15). The reading was done at 326 nm using an UV-Vis detector (Model 490, Waters Associates, Milford, MA, USA). VAD was defined as plasma retinol concentration less than 0.70 mmol/L [28, 29].

Quality control of plasma retinol analysis

The plasma retinol was measured in the laboratory of the *Unité Mixte de Recherche Nutrition et Alimentation (CNESTEN-Université Ibn Tofail)*, Rabat, Morocco. The precision and accuracy of the analytical method were checked periodically by the use of certified reference materials 968d (Fat-soluble Vitamins, carotenoids and cholesterol in Human Serum) from National Institute of Standard and Technology (Lot No H-479, NIST; Gaithersburg, MD, USA). The analysis of reference material showed a loss of 5% during the extractions

that was considered in the calculation of serum retinol concentrations.

Otherwise, an in-house reference material (IHRM) was used ($378.9 \pm 3.64 \mu\text{g/L}$). Accordingly, after 20 analysed serum samples, one IHRM sample was analysed and a Shewhart was plotted. All IHRM retinol values during the analytical period were between $\pm 2\text{SD}$. Moreover, the overall CV for the mean retinol concentration of the in-house control plasma was 0.7% within-day [Min = 0.328, Max = 1.056] and 0.988% between days.

Statistical analysis

Differences in means between normally distributed parameters were tested using the independent student-t test. However, the retinol variable did not follow a normal distribution that's why the median and [Min–Max] were added to the table. Mann–Whitney test was used for the comparison and differences were considered statistically significant for p values ≤ 0.05 .

Results

Demographic and clinical characteristics of participants are reported in Table 1. The mean age for TB patients was 31.02 ± 12 years, ranging from 18 to 52 years, whereas for healthy controls, the mean age was 38.6 ± 11.5 years, ranging from 21 to 58 years. The sex ratio (male/female) was 29/15 (1.93) and 21/19 (1.11) for TB patients and healthy controls, respectively.

Overall, 84.1% of TB patients exhibited an abnormal chest X-ray and had a weight loss. Clinical symptoms were also reported. The most common symptoms were hemoptysis and expectoration, reported in 36.4% of patients, while chronic cough and fever were reported respectively in 31.8 and 27.3% of patients.

Table 1 Demographic and clinical characteristics of TB patients and healthy controls

Variables	TB patients (N = 44)	Healthy controls (N = 40)
Age (mean $\pm$ SD)	31.02 ± 12.04	38.6 ± 11.5
Gender, number (%)		
Men	29 (59.1)	21 (52.5)
Women	15 (34.1)	19 (47.5)
HIV status	Negative	Negative
Clinical feature, number (%)		
Hemoptysis	16 (36.4)	Absence of symptoms
Expectoration	16 (36.4)	
Fever	12 (27.3)	
Cough	14 (31.8)	
Weight loss	37 (84.1)	
Abnormality shown by chest X-ray examination number (%)	37 (84.1)	

Plasma retinol concentration was assessed in both TB patients and healthy controls. Overall, the mean plasma retinol concentration was $1.74 \pm 1.09 \mu\text{mol/L}$ in TB patients and $2.8 \pm 0.97 \mu\text{mol/L}$ in healthy controls (Table 2). Comparison between TB patients and healthy controls showed a statistically significant difference ($p < 0.0001$).

Distribution of plasma retinol concentration according to sex was also assessed and is reported in Table 3. No statistically significant difference was observed between men and women in both patients and healthy groups ($p > 0.05$). Interestingly, plasma retinol concentration was lower in TB women as compared to healthy women ($p = 0.04275$). Moreover, a strong statistically significant difference was recorded in TB men compared to healthy men ($p < 0.0001$).

Distribution of plasma retinol concentration according to age was assessed in both patients and healthy groups (Table 3). Results clearly showed that plasma retinol concentration is significantly lower in patients compared to healthy controls in the three age groups. However no significant differences have been observed among the different age categories within the same group: TB patients or the healthy controls ($p > 0.05$).

According to clinical examination and chest ray interpretation, 59% of TB patients have mild TB (26/44) and 41% have severe TB (18/44). Both patients with mild and severe TB exhibited low levels of plasma retinol as compared to healthy controls. Comparison of plasma retinol concentration between patients with mild and severe TB showed no statistical difference ($p > 0.05$) (Table 4).

Discussion

Vitamin A is essential for normal visual function, growth, reproduction, hematopoiesis, and immunity [18]. It can be obtained as retinyl palmitate, from dietary animal sources (liver, fish liver oils, eggs, and dairy products), and as carotenoids from vegetables (dark-green leafy vegetables and deep-orange fruits), which can be converted to retinoid within the intestine and other tissues. Metabolism of vitamin A results in the production of three

Table 2 Vitamin A status of TB patients and healthy controls

Variable	All TB patients (N = 44)	Healthy controls (N = 40)	<i>p</i>
Mean retinol ($\mu\text{mol/L}$)	1.72 ± 1.09	2.8 ± 0.97	< 0.0001
Median	1.40	2.55	
Minimum	0.452	1.122	
Maximum	4.945	5.394	

Table 3 Distribution of plasma retinol concentration according to sex and age

		TB patients		Healthy controls		<i>p</i>
		N	Mean retinol (μmol/L) Median [Min–Max]	N	Mean retinol (μmol/L) Median [Min–Max]	
Sex						
Men	29	1.60 ± 0.8 1.45 [0.45–3.89]		21	2.87 ± 1.01 2.54 [1, 39]	<0.0001
Women	15	1.94 ± 1.52 1.22 [0.55–4.94] <i>p</i> > 0.05		19	2.69 ± 0.93 2.56 [1.12–4.73] <i>p</i> > 0.05	0.04275
Age (years)						
<29	23	1.86 ± 1.18 1.45 [0.53–4.94]		10	2.93 ± 0.88 2.62 [2.04–4.32]	<0.001
30–49	15	1.66 ± 1.12 1.24 [0.45–4.01]		19	2.98 ± 1.05 2.56 [1.17–5.39]	0.0014
>50	6	1.32 ± 0.57 1.24 [0.45–4.01] <i>p</i> > 0.05		11	2.30 ± 0.77 2.32 [1.12–3.27] <i>p</i> > 0.05	0.01

Table 4 Comparison of plasma retinol concentrations in patients with mild and severe TB

Variable	TB patients with		<i>p</i>
	Severe TB (n = 18)	Mild TB (n = 26)	
Mean retinol (μmol/L)	1.49 ± 0.86	1.87 ± 1.22	0.2614
Median [Min–Max]	1.29 [0.45–4.01]	1.40 [0.53–4.94]	

major metabolites: retinol, retinaldehyde and retinoic acid (RA) [30]. RA is recognized as a principal regulatory retinoid implicated in the regulation of more than 500 genes [31], while retinaldehyde plays a unique role as the chromophore of the visual pigment rhodopsin [32, 33].

In Morocco, the vitamin A supplementation strategy is a part of a national program set up by the ministry of health, and is widely used to restore retinol status of women in post-partum and in case of severe infection, like measles. Accordingly, we have planned to evaluate the benefits of vitamin A supplementation when added to treatment of TB patients. As a first step of this evaluation, the assessment of plasma retinol in TB patients compared to healthy controls is necessary.

In this study, plasma retinol concentrations were significantly lower in TB patients than in controls, which is in phase with many studies conducted in different countries. Indeed, epidemiological evidence demonstrates an association between vitamin A and tuberculosis, and usually plasma vitamin A levels are significantly higher in

healthy controls compared to tuberculosis patients [23, 24, 34–38].

It's widely accepted that TB is the major poverty related disease and malnutrition increases susceptibility to *MTB* infection and the severity of the disease [39].

Low levels of plasma retinol observed in TB patients is well discussed and can result from a number of factors, including the decreased intake caused by the loss of appetite in TB patients [37] and the urinary loss that contributes significantly in lowering serum retinol levels in severe infections, which becomes more important in case of fever [40–42]. Moreover, plasma retinol concentration is also affected by the inflammatory status of patients. Indeed, biological evidence clearly showed that transient change in serum retinol levels is also affected by the acute phase response (APR). During the APR, the transcription and translation of positive acute-phase proteins [e.g. C-reactive protein (CRP)] are increased and positive acute phase protein concentrations correlate negatively with serum retinol concentrations [43]. In pulmonary tuberculosis, elevation of CRP is detected and a high CRP is clearly associated with more severe disease [35]. On the other hand, retinol binding protein (RBP) is the principal transport protein for delivering vitamin A from liver stores to peripheral tissues and during the APR, its production is largely decreased affecting the plasma retinol concentration [44].

Of particular interest, the use of plasma retinol evaluation as a marker in the assessment of vitamin A status is controversial. Indeed, transient changes in serum retinol that occur during the APR do not reflect changes in liver reserves and therefore, plasma retinol concentrations cannot be an adequate method to assess vitamin A status during an active APR [21, 45, 46]. Other approaches using labeled vitamin A with stable isotopes (¹³C-retinol dilution test) are widely recommended to evaluate vitamin A status giving information on plasma retinol concentration and liver stores [46].

Moreover, this study showed no significant difference between plasma retinol concentration, and the severity of TB (*p* = 0.2614) and the age of TB patients (*p* > 0.05). Few studies have explored the correlation between VAD and TB severity, among which, Pakasi and coll. have clearly shown that vitamin A was significantly lower in severe TB than in mild TB [37]. This divergence could be explained by the clinical definition of mild/severe TB and the classification criteria, as there's no biological parameter for such stratification. Regarding the correlation of VAD with patients age, our results are in concordance with previous reported data [47]. Interestingly, vitamin concentration is lower in TB age groups as compared to the corresponding healthy groups, and this difference is less pronounced in patients aged over 50 years, that could be due to recurrent malnutrition and decreased

food intake related to elder age. In fact, recent studies reported that malnutrition and risk of malnutrition are highly prevalent among the old adults [48, 49].

Moreover, we reported here that plasma retinol concentration is lower in both men and women TB patients as compared to men and women healthy controls, respectively, and the difference is more pronounced in men. In this context, it is commonly reported that males are more vulnerable to VAD than females [18, 50–52]. On the other hand, worldwide epidemiological data reported that the majority of TB patients are males [42, 43]. Recent finding revealed that sex hormones could be a significant factor for this sex discrimination [53–55]. Indeed, testosterone is immunosuppressive and impairs the macrophages activation [56], while the estrogens are pro-inflammatory mediators able to induce the production of TNF- α and stimulate secretion of INF- γ [57, 58]. Keeping that in view, we can suggest that low plasma concentrations of vitamin A in male TB patients may rely on sex hormones, by analogy to data reported about estrogen which might regulate vitamin D₃ metabolism [59].

Conclusion

This study clearly showed that TB patients exhibit low concentrations of plasma retinol as compared to healthy controls and VAD could be considered as a risk factor influencing infection with *MTB*, the development and the severity of the disease. Hence, vitamin A supplementation may be a potential strategy to increase the host immunity and enhance treatment efficacy. Moreover, other approaches, such as food fortification and nutritional education, could be considered as a good strategy to prevent VAD in the whole population and therefore stimulates an effective response against TB development. Finally, further studies are required in this field to demonstrate deeply the role of Vitamin A in boosting immune system in TB patients.

Abbreviations

MTB: *Mycobacterium tuberculosis*; TB: tuberculosis; RA: retinoic-acid; TACO: tryptophan-aspartate containing coat protein; VAD: vitamin A deficiency; HPLC: high performance liquid chromatography; APR: acute phase response; CRP: C-reactive protein; RBP: retinol binding protein; INF- γ : interferon-gamma; TNF- α : tumor necrosis factor-alpha.

Authors' contributions

MQ participated in sampling, dosage of vitamin A, data analysis and drafted the manuscript; KEK participated in the design of the project, vitamin A assessment and data analysis; HA participated in the conception and design of the study and review of the final manuscript; JEB was in charge of patient recruitment and clinical evaluation; KS participated in the conception and design of the study and review of the final manuscript; MEM participated in the design and coordination of the project and review of the final manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Unité Mixte de Recherche Nutrition et Alimentation, (CNESTEN–Université Ibn Tofail), CNESTEN BP 1382 RP, 10001 Rabat, Morocco. ² Laboratoire de Biochimie-Immunologie, Faculté des Sciences, Rabat, Morocco. ³ Service de Pneumo-Phthisiologie, Hospital Moulay Youssef, CHU Rabat, Rabat, Morocco.

Acknowledgements

We would like to thank all patients and healthy controls for their participation. We are sincerely grateful to the clinicians and nurses of Moulay Youssef university hospital and the Regional Center of Blood Transfusion (RCBT) of Rabat for their collaboration in this study.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

The dataset of the current study is available from the corresponding author at a reasonable request.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

The study protocol was approved by the Ethical Committee for Biomedical Research, School of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University of Rabat, and a written informed consent was obtained from each study subject.

Funding

The authors declare that no funding was received from any funding agency.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 30 November 2016 Accepted: 6 August 2017

Published online: 23 August 2017

References

- WHO. WHO | Global tuberculosis report 2015. WHO. 2015. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. Accessed 4 Oct 2016.
- WHO. 2007 Tuberculosis facts. 2007. http://www.who.int/tb/publications/2007/factsheet_2007.pdf. Accessed 16 Aug 2017.
- Chandra RK. Nutrition and the immune system: an introduction. *Am J Clin Nutr*. 1997;66:460S–35.
- Katona P, Katona-Apte J. The Interaction between Nutrition and Infection. *Clin Infect Dis*. 2008;46:1582–8.
- Guo Y, Brown C, Ortiz C, Noelle RJ. Leukocyte homing, fate, and function are controlled by retinoic acid. *Physiol Rev*. 2015;95:125–48.
- Raverdeau M, Mills KHG. Modulation of T cell and innate immune responses by retinoic Acid. *J Immunol Baltim Md*. 1950;2014(192):2953–8.
- Hall JA, Cannons JL, Grainger JR, Santos LMD, Hand TW, Naik S, et al. Essential role for retinoic acid in the promotion of CD4+T cell effector responses via retinoic acid receptor alpha. *Immunity*. 2011;34:435–47.
- Brown CC, Esterhazy D, Sarde A, London M, Pullabhatla V, Osma-Garcia I, et al. Retinoic acid is essential for Th1 cell lineage stability and prevents transition to a Th17 cell program. *Immunity*. 2015;42:499–511.
- Anand PK, Kaul D, Sharma M. Synergistic action of vitamin D and retinoic acid restricts invasion of macrophages by pathogenic mycobacteria. *J Microbiol Immunol Infect Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi*. 2008;41:17–25.
- Ferrari G, Langen H, Naito M, Pieters J. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell*. 1999;97:435–47.
- Gogulamudi VR, Dubey ML, Kaul D, Atluri VSR, Sehgal R. Downregulation of host tryptophan-aspartate containing coat (TACO) gene restricts the entry and survival of *Leishmania donovani* in human macrophage model. *Front Microbiol*. 2015;6:946.

12. Anand PK, Kaul D. Downregulation of TACO gene transcription restricts mycobacterial entry/survival within human macrophages. *FEMS Microbiol Lett*. 2005;250:137–44.
13. Yamada H, Mizuno S, Ross AC, Sugawara I. Retinoic acid therapy attenuates the severity of tuberculosis while altering lymphocyte and macrophage numbers and cytokine expression in rats infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Nutr*. 2007;137:2696–700.
14. Wheelwright M, Kim EW, Inkeles MS, De Leon A, Pellegrini M, Krutzyk SR, et al. All-trans retinoic acid-triggered antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* is dependent on NPC2. *J Immunol Baltim Md*. 1950;2014(192):2280–90.
15. McDowell EM, Keenan KP, Huang M. Effects of vitamin A-deprivation on hamster tracheal epithelium. A quantitative morphologic study. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1984;45:197–219.
16. Molloy CJ, Laskin JD. Effect of retinoid deficiency on keratin expression in mouse bladder. *Exp Mol Pathol*. 1988;49:128–40.
17. Shetty P. Nutrition, immunity and infection. UK: Library of Congress Cataloging-in-Publication Data; 2010.
18. Sommer A, West KP, Olson JA, Ross AC. Vitamin A deficiency: health. New York: Survival and Vision. Oxford University Press; 1996.
19. Villamor E, Fawzi WW. Effects of vitamin A supplementation on immune responses and correlation with clinical outcomes. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18:446–64.
20. Warden RA, Strazzari MJ, Dunkley PR, O'Loughlin EV. Vitamin A-deficient rats have only mild changes in jejunal structure and function. *J Nutr*. 1996;126:1817–26.
21. Stephensen CB. Vitamin A, infection, and immune function. *Annu Rev Nutr*. 2001;21:167–92.
22. Twining SS, Schulte DP, Wilson PM, Fish BL, Moulder JE. Vitamin A deficiency alters rat neutrophil function. *J Nutr*. 1997;127:558–65.
23. Karyadi E, Schultink W, Nelwan RHH, Gross R, Amin Z, Dolmans WMV, et al. Poor micronutrient status of active pulmonary tuberculosis patients in Indonesia. *J Nutr*. 2000;130:2953–8.
24. Ramachandran G, Santha T, Garg R, Baskaran D, Iliyas SA, Venkatesan P, et al. Vitamin A levels in sputum-positive pulmonary tuberculosis patients in comparison with household contacts and healthy "normals". *Int J Tuberc Lung Dis*. 2004;8:1130–3.
25. Wiid I, Seaman T, Hoal EG, Benade AJ, Van Helden PD. Total antioxidant levels are low during active TB and rise with anti-tuberculosis therapy. *IUBMB Life*. 2004;56:101–6.
26. Ministère de la Santé. Manuel de référence du système d'information sanitaire du programme national de lutte antituberculeuse. 2016. <http://www.sante.gov.ma/Documents/2016/02/Manuel%20de%20r%C3%A9f%C3%A9rence%20du%20SIS%20du%20PNLAT%20VF%2012%2002%202016.pdf>. Accessed 16 Aug 2017.
27. Granado-Lorencio F, Olmedilla-Alonso B, Herrero-Barbudo C, Blanco-Navarro I, Blázquez-García S, Pérez-Sacristán B. Simultaneous determination of vitamins A, E and 25-OH-vitamin D: application in clinical assessments. *Clin Biochem*. 2006;39:180–2.
28. de Pee S, Dary O. Biochemical indicators of vitamin A deficiency: serum retinol and serum retinol binding protein. *J Nutr*. 2002;132(9 Suppl):2895S–901S.
29. WHO. WHO | Indicators for assessing vitamin A deficiency and their application in monitoring and evaluating intervention programmes. WHO. 1996. http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/vitamin_a_deficiency/WHO_NUT_96.10/en/. Accessed 27 Dec 2015.
30. Duester G. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell*. 2008;134:921–31.
31. D'Ambrosio DN, Clugston RD, Blaner WS. Vitamin A metabolism: an update. *Nutrients*. 2011;3:63–103.
32. Ross AC. Cellular metabolism and activation of retinoids: roles of cellular retinoid-binding proteins. *FASEB J*. 1993;7:317–27.
33. Wald G. Molecular basis of visual excitation. *Science*. 1968;162:230–9.
34. Ginawi IA. Effect of zinc and vitamin A supplementation along with inter-tubercular treatment in pulmonary tuberculosis in north Indian patients. *Int J Pharm Sci Res*. 2013;4(9):3426.
35. Koyanagi A, Kuffó D, Gresely L, Shenkin A, Cuevas LE. Relationships between serum concentrations of C-reactive protein and micro-nutrients, in patients with tuberculosis. *Ann Trop Med Parasitol*. 2004;98:391–9.
36. Oh J, Choi R, Park H-D, Lee H, Jeong B-H, Park H-Y, et al. Evaluation of vitamin status in patients with pulmonary tuberculosis. *J Infect*. 2017;74:272–80.
37. Pakasi TA, Karyadi E, Wibowo Y, Simanjuntak Y, Suratih NMD, Salean M, et al. Vitamin A deficiency and other factors associated with severe tuberculosis in Timor and Rote Islands, East Nusa Tenggara Province, Indonesia. *Eur J Clin Nutr*. 2009;63:1130–5.
38. van Lettow M, Harries AD, Kumwenda JJ, Zijlstra EE, Clark TD, Taha TE, et al. Micronutrient malnutrition and wasting in adults with pulmonary tuberculosis with and without HIV co-infection in Malawi. *BMC Infect Dis*. 2004;4:61.
39. Müller O, Krawinkel M. Malnutrition and health in developing countries. *Can Med Assoc J*. 2005;173:279–86.
40. Mitra AK, Alvarez JO, Stephensen CB. Increased urinary retinol loss in children with severe infections. *Lancet Lond Engl*. 1998;351:1033–4.
41. Mitra AK, Alvarez JO, Wahed MA, Fuchs GJ, Stephensen CB. Predictors of serum retinol in children with shigellosis. *Am J Clin Nutr*. 1998;68:1088–94.
42. Stephensen CB, Alvarez JO, Kohatsu J, Hardmeier R, Kennedy JL, Gammon RB. Vitamin A is excreted in the urine during acute infection. *Am J Clin Nutr*. 1994;60:388–92.
43. Filteau SM, Morris SS, Abbott RA, Tomkins AM, Kirkwood BR, Arthur P, et al. Influence of morbidity on serum retinol of children in a community-based study in northern Ghana. *Am J Clin Nutr*. 1993;58:192–7.
44. Quadro L, Blaner WS, Salchow DJ, Vogel S, Piantadosi R, Gouras P, et al. Impaired retinal function and vitamin A availability in mice lacking retinol-binding protein. *EMBO J*. 1999;18:4633–44.
45. Rosales FJ, Ross AC. A low molar ratio of retinol binding protein to transthyretin indicates vitamin A deficiency during inflammation: studies in rats and a posterior analysis of vitamin A-supplemented children with measles. *J Nutr*. 1998;128:1681–7.
46. Tanumihardjo SA. Vitamin A: biomarkers of nutrition for development. *Am J Clin Nutr*. 2011;94:658S–65S.
47. Ali W. Serum zinc levels and its association with vitamin A levels among tuberculosis patients. 2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3961917/?report=printable>. Accessed 13 Dec 2015.
48. Durán Alert P, Milà Villarroel R, Formiga F, Virgili Casas N, Vilarasau Farré C. Assessing risk screening methods of malnutrition in geriatric patients: mini Nutritional Assessment (MNA) versus geriatric nutritional risk index (GNRI). *Nutr Hosp*. 2012;27:590–8.
49. Shakersain B, Santoni G, Faxén-Irving G, Rizzuto D, Fratiglioni L, Xu W. Nutritional status and survival among old adults: an 11-year population-based longitudinal study. *Eur J Clin Nutr*. 2016;70:320.
50. Darnton-Hill I, Webb P, Harvey PWJ, Hunt JM, Dalmiya N, Chopra M, et al. Micronutrient deficiencies and gender: social and economic costs. *Am J Clin Nutr*. 2005;81:1:198S–205S.
51. McLaren DS, Frigg M. Sight and life manual on vitamin A deficiency disorders (VADD). *Commun Eye Health*. 2000;13:28.
52. Yadav RJ. Prevalence of vitamin A deficiency in Bihar: a gender perspective. *Indian J Prev Med*. 2006;37:4.
53. Bini EI, Mata Espinosa D, Marquina Castillo B, Barrios Payán J, Colucci D, Cruz AF, et al. The influence of sex steroid hormones in the immunopathology of experimental pulmonary tuberculosis. *PLoS ONE*. 2014;9:e93831.
54. Neyrolles O, Quintana-Murci L. Sexual inequality in tuberculosis. *PLoS Med*. 2009;6:e1000199. doi:10.1371/journal.pmed.1000199.
55. Nhamoye-bonde S, Leslie A. Biological differences between the sexes and susceptibility to tuberculosis. *J Infect Dis*. 2014;209(Suppl 3):S100–6.
56. D'Agostino P, Milano S, Barbera C, Di Bella G, La Rosa M, Ferlazzo V, et al. Sex hormones modulate inflammatory mediators produced by macrophages. *Ann NY Acad Sci*. 1999;876:426–9.
57. Fox HS, Bond BL, Parslow TG. Estrogen regulates the IFN-gamma promoter. *J Immunol Baltim Md*. 1950;199(1146):4362–7.
58. Zuckerman SH, Bryan-Poole N, Evans GF, Short L, Glasebrook AL. In vivo modulation of murine serum tumour necrosis factor and interleukin-6 levels during endotoxemia by oestrogen agonists and antagonists. *Immunology*. 1995;86:18–24.
59. Nashold FE, Spach KM, Spanier JA, Hayes CE. Estrogen controls vitamin D₃-mediated resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis by controlling vitamin D₃ metabolism and receptor expression. *J Immunol*. 2009;183:3672–81.

IV Discussion

Par ce projet de thèse, nous avons visé principalement, la recherche des facteurs génétiques qui pourraient être localisés dans la région chromosomique 8q12-13, en étudiant les deux gènes candidats *NSMAF* et *CYP7A1*.

Concernant le gène *NSMAF*, nos données montrent que le génotype CT rs1050504 pourrait prédisposer au développement de la TB pulmonaire, tandis que le génotype TT semble jouer un rôle protecteur contre la TB. A notre connaissance notre investigation constitue le premier travail qui a associé le gène *NSMAF* et la prédisposition de développer la TB. Rares sont les données disponibles dans la littérature, permettant d'interpréter et discuter ce résultat. Néanmoins, si on s'intéresse à la position du variant génétique, le rs1050504 est localisé dans la région non traduite (3'UTR) du gène *NSMAF*. Les variants 3'UTR sont particuliers puisqu'ils peuvent entraîner des différences observées dans l'expression des gènes (Skeeles et al., 2013). Les variations génétiques dans ces régions peuvent affecter l'expression génique par différents mécanismes. Cela inclut la modification des sites de reconnaissance des microARNs (miARN), des protéines de liaison à l'ARN et de la machinerie de polyadénylation (Ghanbari et al., 2015; Skeeles et al., 2013; Ryan et al., 2010). Une étude génétique a révélé que l'allèle sauvage rs1050504-C est situé dans un site de liaison du miARN 154-3p (Ghanbari et al., 2015), qui agirait comme suppresseur de plusieurs tumeurs malignes (Kai et al., 2015; Lin et al., 2015). Ce site de liaison du miARN est affecté par la mutation qui le transforme en un autre site de liaison, dont le rôle n'a pas été encore exploré (Ghanbari et al., 2015). Cette découverte est d'un intérêt particulier, surtout quand on sait que FAN, la protéine codée par le gène *NSMAF*, est impliquée dans la signalisation apoptotique (O'Brien et al., 2003; B. Ségui et al., 2001; Ségui et al., 1999). L'apoptose est considérée comme une défense innée particulière contre *Mtb*, et elle est associée avec une viabilité réduite des agents pathogènes dans les macrophages infectés (Behar et al., 2011; Chen et al., 2006). C'est pour cette raison que les souches de *Mtb* virulentes ont développé des mécanismes pour échapper à ce processus en employant des moyens divers, tels que la stimulation de la production des protéines de la famille des anti-apoptotiques Bcl-2 (B cell lymphome 2), qui peuvent bloquer la libération du cytochrome c de mitochondries (Chen et al., 2001). Ainsi, en se basant sur tout ceci, nous pouvons supposer que la présence du génotype CT pourrait créer des conditions conduisant à une régulation négative du FAN. Inversement, en cas du génotype TT, l'affinité de liaison du miARN pourrait diminuer, conduisant théoriquement à une augmentation de la production FAN. À son tour, une augmentation du FAN pourrait améliorer la signalisation apoptotique pour se protéger contre la PTB et/ou probablement affecterait d'autres rôles que la protéine FAN joue dans la réponse immunitaire, telle que la réorganisation de l'actine dans les macrophages (Peppelenbosch et al., 1999b) et la capacité

migratoire des leucocytes en réponse à la signalisation chimiotactique (Boecke et al., 2012), ou également son rôle documenté dans l'induction du TNF- α et la migration des neutrophiles (Montfort et al., 2009). Les neutrophiles ont récemment suscités de l'intérêt pour leur rôle dans la protection contre la TB et ont été proposés comme étant le type de cellules phagocytaires principalement infecté dans la TB pulmonaire (Eum et al., 2010).

D'autre part, vu que la protéine FAN est un composant essentiel pour l'activation des sphingomyélinases neutres (NSMs: neural sphingomyelinases) 2 et 3 (Philipp et al., 2010; Krut et al., 2006). Il est probable que le génotype TT pourrait influencer la réponse immunitaire de l'hôte en assurant une régulation optimale des NSMs. Surtout si on sait qu'une infection par le BCG a entraîné une stimulation rapide de la NSM2 chez des macrophages (Li et al., 2016).

Il a été rapporté également, que la NSM2 est importante dans la signalisation du récepteur des lymphocytes T (TCR). De plus, l'activité NSM2 s'est avérée jouer un rôle important dans le transport du cholestérol de la membrane plasmique vers le réticulum endoplasmique et la production d'esters de cholestérol (cholesteryl esters) dont l'accumulation était essentielle pour soutenir la prolifération des lymphocytes T humaines, au contraire leur inhibition altère l'expansion induite par le TCR des lymphocytes T CD4⁺ et TCD8⁺. Il a été montré aussi que l'absence de la NSM2 induit une accumulation anormale du cholestérol dans les cellules. En effet, la NSM2 assure ses activités en régulant les lipids de la membrane plasmique et l'homéostasie du cholestérol (Börtlein et al., 2019).

L'homéostasie du cholestérol qui joue un rôle crucial dans le fonctionnement du système immunitaire, est régulée principalement par la voie du cholestérol 7- α -hydroxylase et donc sous la régulation du gène *CYP7A1* (Andersen, 2018; Liu et al., 2016; Tall and Yvan-Charvet, 2015; Schwarz et al., 1998).

Dans ce présent projet de thèse nous avons rapporté un autre lien qui implique le cholestérol dans la réponse immunitaire. À notre connaissance, c'est le premier travail qui a associé des variants génétiques du gène *CYP7A1* avec le risque de développer la TB.

L'analyse statistique de nos données a révélé une association significative entre l'allèle A, le génotype homozygote AA du SNP rs3808607 et la TB. Il semble que les porteurs du génotype AA sont deux fois ($\sim \times 1.94$) plus vulnérables à développer une TB. De même, la fréquence du génotype homozygote AA est plus élevée chez les patients avec TB pleurale en comparaison des contrôles sains (42% contre 28%), bien que cette différence n'ait pas atteint la signification statistique. Le manque d'association observé dans ce cas pourrait être attribué à la petite taille du groupe de patients pTB.

Ces résultats obtenus par PCR-RFLP ont été confirmés (avec 100 % de concordance) par le séquençage, qui est considéré comme la technique de référence.

Récemment, nos résultats ont été confirmés dans une autre population nord africaine (égyptienne) rapportant également une association entre le rs3808607 avec la TB pulmonaire chez une population égyptienne (Al-Sheikh et al., 2018).

Nous avons aussi pu confirmer la localisation du rs3808607 à la position 58500365 comme décrit dans la littérature (<https://www.snpedia.com/index.php/Rs3808607>) dans le promoteur du gène *CYP7A1* (figure 27). Cette localisation est stratégique plaçant le rs3808607 dans un DHS (site d'hypersensibilité de DNase I) ; Ces sites sont des régions de la chromatine sensibles au clivage d'ADN par l'enzyme désoxyribonucléase (Wang et al., 2012; Boyle et al., 2008). Il est intéressant de noter que ce SNP est localisé à 53pb du site Bare II habritant le site II de liaison de PPAR α /RXR α et à 57pb du site Bare II où on trouve le récepteur de la vitamine D et de l'acide 9-cis rétinoïque (vitamine A) (VDR/ RXR α). Il est aussi localisé à 132 plus loin du site Bare I où se trouve un deuxième récepteur VDR/RXR α (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/110596866>). Ainsi par son emplacement stratégique, ce variant génétique pourrait influencer l'interaction des facteurs de transcription avec leurs récepteurs et par conséquent pourrait moduler l'expression de gène du *CYP7A1*.

Par ailleurs, il a été rapporté que le génotype AA du *CYP7A1* était associé à une concentration élevée de LDL (low-density lipoprotein), des taux plus élevés de triglycérides sériques et à des concentrations de cholestérol total significativement élevées (Hofman et al., 2004; Hegele et al., 2001). D'autres travaux ont démontré que l'allèle C est associé à une expression génique accrue (Wang et al., 2018; De Castro-Orós et al., 2011).

L'altération de la protéine CYP7A1 entraîne l'absence d'activité enzymatique et augmente le taux du cholestérol plasmatique (Li et al., 2011; Pullinger et al., 2002). L'expression élevée du *CYP7A1* chez les individus CC induit une augmentation du catabolisme du cholestérol et par conséquent le cholestérol total plasmatique diminue (Li et al., 2011).

Nous pourrions supposer que les individus CC sont protégés de la TB probablement parce qu'ils ont un contrôle efficace de l'homéostasie du cholestérol et par conséquent une réduction du contenu cellulaire en cholestérol. Ainsi, la bactérie sera privée de sa source de carbone (Soto-Ramirez et al., 2017) qui lui permet de persister, et éventuellement sera éradiquée par la suite.

Par ailleurs, en catabolisant le cholestérol, la CYP7A1 produit les acides biliaires (AB) qui sont les ligands naturels de plusieurs récepteurs comme le FXR (Farnesoid X receptor) et le VDR (vitamin D receptor). Les AB régulent l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et du glucose (Han, 2018; Zhang et al., 2010; Lambert et al., 2003) et participent dans divers processus biologiques comme l'absorption des vitamines liposolubles (A, D, E et K) de l'intestin grêle (Ding et al., 2015; Wang et al., 2008).

Ceci est intéressant, particulièrement quand on sait que l'expression du FXR a été détectée dans les cellules épithéliales des voies respiratoires humaines, les cellules endothéliales pulmonaires et surtout dans les macrophages alvéolaires (Chen et al., 2016; Hendrick et al., 2014; He et al., 2006); suggérant le rôle probable que peuvent jouer les AB dans la réponse immunitaire anti-tuberculeuse. En effet, il a été rapporté que les AB sont capables de réduire la viabilité cellulaire en augmentant la production des espèces réactives oxygénées (ROS: Reactifs oxygen species) (Chen et al., 2016). De plus, les AB peuvent induire la migration cellulaire des fibroblastes pulmonaires, qui sont essentiels pour le maintien de l'intégrité du granulome (Zhai et al., 2019). Hypothétiquement, il est probable que par l'activation de ces deux processus biologiques hautement sollicités dans la défense contre le *Mtb*, à savoir la production des ROS et la migration cellulaire vers le site de l'infection, les individus homozygotes CC ayant une activité élevée du *CYP7A1*, pourraient être protégés.

Il convient de mentionner que même si les variants génétiques rs3808607 et rs1050504 sont associés à la TB, rien ne prouve pour autant qu'ils sont les SNP causals, nous ne pouvons pas exclure la possibilité qu'ils soient en déséquilibre de liaison (LD: Linkage disequilibrium) avec un ou d'autres polymorphismes voisins localisés sur le même gène ou sur un gène proche. A ce propos, deux variants génétiques ont été génétiquement associés à la TB dans une population marocaine, il s'agit des rs2726600 et rs1568952, localisés au sein du gène *TOX* (Grant et al., 2013). En plus, l'analyse des haplotypes que nous avons réalisés, a révélé que les deux variant génétiques rs3808607 et rs1050504, sont en déséquilibre de liaison. Néanmoins, les valeurs de D' et r^2 indiquent que ce LD est faible. Nos résultats ont également montré que lorsque le génotype AA rs3806607 et le génotype CT rs1050504 sont co-hérités, la susceptibilité à développer la TB est fortement significative (OR 13,5; $p = 0,0006$). Nous pourrions supposer que ces deux génotypes (haplotype AA, CT) peuvent s'interagir pour moduler l'expression génique du *CYP7A1* et *NSMAF* de façon à baissser la réponse immunitaire inefficace et permettre ainsi au bacille de contourner ces mécanismes en sa faveur. En outre, le rs3808607 est en déséquilibre de liaison fort avec un variant génétique potentiel le rs9297994. Ces deux SNPs peuvent s'interagir pour moduler l'expression génique du *CYP7A1* (Wang et al., 2018). Par ailleurs, nous avons identifié par séquençage trois nouvelles mutations potentielles (NC_000008.11: g. 58500624 C>T; NC_000008.11: g. 58500624 del T; NC_000008.11: g. 58500260 G>A) qui pourraient être en déséquilibre de liaison avec le rs3808607 ou rs1050504.

D'autre part, l'analyse de nos données selon le sexe a révélé surprenamment que l'association est maintenue uniquement chez les hommes. Il semblerait que les hommes ayant le génotype AA rs3808607 sont plus susceptibles à PTB ($p=0.02$; OR 95% 2.3 [1.1- 4.8]), de même que les hommes

porteurs du CT rs1050504, contrairement à ceux avec le génotype TT rs1050504 et l'allèle C rs3808607 ($p=0.22$; OR 95% 0.53 [0.31- 0.91]), qui semblent être protégés contre la PTB.

Nos résultats constituent une preuve de plus sur l'inégalité sexuelle observée dans la prédisposition à la TB; En fait, l'épidémiologie globale de la TB est caractérisée par une différence significative dans la prévalence, l'incidence et la mortalité entre les hommes et les femmes (Holmes et al., 1998). Dans la plupart des pays, le taux de notification de la TB chez les séronégatifs est deux fois plus élevé chez les hommes que chez les femmes (WHO, 2018b). Ce rapport variait de 1.56 à 2.73 et, bien qu'il diffère d'un pays à l'autre, il semblerait que les hommes sont plus touchés que les femmes, sans distinction d'origine ethnique ou de lieu géographique. La cause de cette différence n'est pas entièrement comprise, au début elle a été attribuée à des obstacles socio-économiques et culturelles liés à l'accès au soin empêchant le diagnostic pour les femmes et conduisant ainsi à une sous notification; Cependant, des études épidémiologiques plus larges ont conclu que la réduction de l'accès des femmes aux établissements de santé n'influçait pas de manière significative cette différence observée (Jiménez-Corona et al., 2006; Hamid Salim et al., 2004; Borgdorff et al., 2000). Ensuite, d'autres facteurs de risque auxquels l'homme est généralement plus exposé ont été incriminés, nous citons particulièrement le tabagisme (Schurz et al., 2019; Nhamoyebonde and Leslie, 2014). Il a été rapporté que la nicotine, agissant à travers le récepteur nicotinique $\alpha 7$, est capable de réduire la production de TNF- α par les macrophages. La fumée de tabac est liée à un dysfonctionnement ciliaire, à une diminution des performances des macrophages alvéolaires, et à une altération de l'activité des cellules dendritiques pulmonaires, elle peut aussi induire une faible production d'IL-12, ce qui peut favoriser par conséquent le développement de la TB (Silva et al., 2018; Leung et al., 2015; Alavi-Naini et al., 2012).

Par ailleurs, un autre facteur important a été proposé pour expliquer cette discrimination sexuelle, il s'agit des hormones sexuelles ; en effet ces derniers ont une influence sur le système immunitaire (Bini et al., 2014; Nhamoyebonde and Leslie, 2014; Neyrolles and Quintana-Murci, 2009). Il a été démontré que les femmes ont un système immunitaire plus robuste, ce qui est en partie provoqué par les hormones sexuelles qui contrôlent le développement et la maturation des cellules immunitaires (lymphocytes T, macrophages, neutrophiles) impliqués dans la lutte contre la TB (Taneja, 2018; Klein and Flanagan, 2016; Klein et al., 2015). Les hormones sexuelles affectent la réponse immunitaire de type 1 (Th1). La testostérone augmente la production de l'IL-10 tout en régulant négativement l'IFN- γ (Lotter et al., 2013); Alors que les œstrogènes augmentent la production d'IFN- γ , de TNF α et d'IL-12 tout en supprimant la production d'IL-10 (Pinzan et al., 2010). En outre, l'estradiol, une hormone féminine, améliore l'activation des macrophages, qui jouent un rôle central dans le contrôle de la TB par la destruction active des mycobactéries (Neyrolles and Quintana-Murci, 2009; Zuckerman et al., 1995; Fox et al., 1991), tandis que la

testostérone diminue l'activation des macrophages en diminuant l'expression de TLR4, un récepteur essentiel pour la détection de *Mtb* et le déclenchement de la réponse immunitaire innée (Fish, 2008; D'Agostino et al., 1999).

Cependant, il existe des différences de réponses immunitaires basées sur le sexe entre les filles et les garçons même avant la puberté, aussi chez les femmes ménopausées et les hommes âgés (Klein et al., 2015). Ce qui indique que l'inégalité sexuelle observée, implique d'autres facteurs en plus de ceux précédemment cités. A ce propos, en se basant sur plusieurs arguments, l'influence du chromosome X a été suggérée comme facteur impliqué dans la discrimination sexuelle observée dans les maladies infectieuses (Schurz et al., 2019). Tout d'abord, les nombreuses observations rapportant que les femmes sont plus protégées des maladies infectieuses que les hommes (Moulton, 2018; Walter et al., 2018; Klein and Flanagan, 2016; Klein et al., 2015; Nhamoyebonde and Leslie, 2014; Guerra-Silveira and Abad-Franch, 2013). À cela s'ajoute, que l'homme est haploïde pour le chromosome X. Et enfin, la forte densité de gènes liés au système immunitaire qui sont situés sur le chromosome X, comme par exemple les gènes qui codent pour le TLR7 (toll-like receptor 7), TLR8 et l'IRAK1 (Interleukin-1 receptor associated kinase 1), une molécule clef dans la régulation de voies de signalisation dépendante des TLRs (Kawai and Akira, 2006; Klein et al., 2015; Schurz et al., 2019). On trouve aussi le gène *AR* (androgen receptor) codant pour le récepteur d'androgène, un récepteur d'hormone sexuelle qui inhibe la production d'anticorps, ce qui montre que l'effet des hormones sexuelles peut-être amplifié par les gènes des récepteurs d'hormones sexuelles liés au X (Klein et al., 2015). En plus, un nombre de gènes qui codent pour des éléments de régulation immunitaire sont localisés sur ce chromosome, comme par exemple le NF- κ B, un facteur de transcription impliqué dans plusieurs voies immunitaires (Bustamante et al., 2011b). En outre, ce chromosome contient des régulateurs transcriptionnels dits micro-ARN (miARN) qui sont impliqués dans la régulation de l'expression génique par répression de la traduction de l'ARNm ou par sa dégradation (Klein et al., 2015). Enfin, plusieurs polymorphismes des gènes *NEMO* (NF- κ B essential modulator) et *CYBB* (Cytochrome b-245, beta polypeptide) ont été associés au syndrome de prédisposition sélective à des infections par des mycobactéries peu virulentes (MSMD: Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases) (Bustamante et al., 2011a, 2007; Filipe-Santos et al., 2006b), ce qui soutient également l'éventuelle influence du chromosome X dans la susceptibilité à la TB.

Par ailleurs, étant donné que les populations peuvent présenter des profils génétiques de polymorphismes très variables, il nous a paru nécessaire d'effectuer une caractérisation des six SNP génotypés pour la première fois chez une population d'origine nord-africaine. Nos résultats peuvent constituer des données de bases pour des futures recherches. Comme en témoigne le projet HapMap,

les populations peuvent présenter des profils génétiques de polymorphismes mineurs très variables. Ainsi, nous avons effectué des calculs des fréquences d'allèles mineurs (MAF: Minor Allele Frequency) pour tous les SNPs étudiés. Ensuite, nous avons comparé nos résultats aux données répertoriées par le consortium International HapMap Project et 1000 Genomes project. Vu la position géographique particulière du Maroc, qui le place entre deux continents l'Europe et l'Afrique, nous avons basé nos comparaisons sur l'ensemble de données de la population Européenne (Europe du Nord et de l'Ouest) et de la population Africaine (Afrique de l'Est et de l'Ouest).

L'analyse de nos résultats concernant les SNPs génotypés pour le gène *CYP7A1*, révèlent que le rs8192875, l'allèle T pourrait être considéré comme un allèle rare. Ce résultat est similaire à celui observé dans les populations caucasiennes (0) et différent de celui rapporté dans les populations africaines (Mandinka de Gambie 0.04; Yoruba de Nigeria 0.03; Nigériens de l'Est 0.02). En outre, la fréquence de l'allèle T de rs8192879 rapportée ici (0.24) est plus proche des MAF observées dans des populations africaines (Luyia du Kenya 0.25; Nigériens de l'Est 0.2; Yoruba de Nigeria 0.19; Mandinka de Gambie 0.13). En revanche, cette fréquence allélique est légèrement inférieure à celles rapportées dans les populations caucasiennes (Ibériens d'Espagne 0,32; Toscans d'Italie et Anglais d'Angleterre et d'Ecosse 0.39).

Lorsque nous avons analysé les données relatives aux fréquences des polymorphismes génotypés pour le gène *NSMAF*, ainsi la MAF de l'allèle C du rs3808607 dans la population marocaine est de 0.46 qui est intermédiaire entre les MAFs observées dans les populations européennes (Ibériens d'Espagne 0.55; Toscans d'Italie 0.59; Finlandais de Finlande 0.53; Anglais d'Angleterre et d'Ecosse 0.57) et celles dans les populations africaines (Yoruba de Nigeria 0.40; Mandinka de Gambie 0.41; Mende de Sierra Leone 0.32).

Concernant l'allèle mutant rs2228505-C, sa fréquence dans notre population est 0.09, qui est similaire à celle observée dans la population africaine de l'ouest (Mandinka de Gambie et Yoruba de Nigeria 0.1) et plus supérieure que la MAF dans la population européenne (Ibériens d'Espagne 0.02; Toscans d'Italie 0.01).

En ce qui concerne le résultat du rs36067275 C> T SNP, nous avons constaté que l'allèle T mutant est absent dans la population marocaine similairement aux populations européennes (Ibériens d'Espagne; Toscans d'Italie; Finlandais de Finlande; Anglais d'Angleterre et d'Ecosse). Contrairement, aux populations de l'Afrique (Luhye de Kineya 0.04; Yoruba et Esande Nigeria et Mandinka de Gambie 0.02), où cet allèle est présent.

Nos résultats rejoignent les données rapportés dans la littérature affirmant que le génome de la population marocaine porte les traces d'une influence génétique européenne et sub-saharienne (Arauna et al., 2019; Coudray et al., 2009). Les études anthropologiques et génétiques ont révélé la

complexité du peuplement d'Afrique du Nord qui est le résultat d'un mélange de différentes migrations liées au passé de ces peuplements (Arauna et al., 2019; Font-Porterias et al., 2018). En effet, les écrits historiques affirment que ces populations ont vu l'arrivée de divers groupes: les Phéniciens, les Romains, les Vandales et les Byzantins, puis, la conquête arabe depuis la péninsule Arabique, suivi par, l'empire Ottoman vers le 16^{ème} siècle et enfin, la colonisation Européenne des XVIII^{ème} et XIX^{ème} siècles (Arauna et al., 2017). Par ailleurs la région nord-africaine a reçu un flux de gènes récent provenant de l'Afrique subsaharienne, relié au commerce des esclaves vers le Maroc (Arauna et al., 2017; Henn et al., 2012).

D'autre part, lorsque nous avons analysé les données relatives aux fréquences des polymorphismes génotypés pour le gène *NSMAF*, les résultats révèlent quant à la MAF du rs1050504-T observée dans la population marocaine population est 0.29, plus proche de celle rapportée dans la population caucasienne (0.34); curieusement, elle est nettement plus supérieure de celle observée dans les populations africaines (Yoruba de Nigeria 0.08; Mandinka de Gambie 0.03; Mende de Sierra Leone 0.06).

Considérons la divergence interéthnique rapportée liée à l'histoire d'exposition à la TB par plusieurs études épidémiologiques et qui montre que les populations dont les ancêtres sont caucasiens ont une faible prévalence par rapport à celles dont les ancêtres sont africains (Stead et al., 1990; Nahid et al., 2011; Fares, 2012). Nous pourrions suggérer le rs1050504-T comme allèle potential de résistance à la TB impliquée dans cette inégalité ethnique.

Dans la deuxième partie de ce projet de thèse, nous avons évalué les concentrations plasmatiques du rétinol qui étaient significativement inférieures chez les patients tuberculeux par rapport aux contrôles sains. Nos résultats corroborent avec de nombreuses études menées dans différents pays. En réalité, les preuves épidémiologiques démontrent une association entre la vitamine A et le développement de la TB (Keflie et al., 2018; Oh et al., 2017; Ginawi, 2013; Pakasi et al., 2009; Koyanagi et al., 2004; Ramachandran et al., 2004; van Lettow et al., 2004; Karyadi et al., 2000).

Ces faibles concentrations de rétinol plasmatique observées chez les patients tuberculeux peuvent être causées par une diminution de la consommation due à une perte d'appétit chez les patients tuberculeux (Pakasi et al., 2009), pertes urinaires contribuant de manière significative à la baisse des taux de rétinol sérique dans les infections sévères, ce qui est plus important en cas de fièvre (Mitra et al., 1998a, 1998b; Stephensen et al., 1994). En plus, les preuves biologiques ont montré que la variation transitoire des taux de rétinol sérique est également affectée par la "réaction de phase aiguë" (RPA). Au cours de laquelle, les gènes codant pour des protéines dites PPA (Protéines de phase aiguë) positives (par exemple la protéine C-réactive (CRP)), sont surexprimés;

L'augmentation de la production des PPA positives est corrélée aux faibles concentrations sériques du rétinol (Filteau et al., 1993). En cas de TB pulmonaire, le taux de CRP augmente et marque l'état inflammatoire chez le patient; plus la maladie est sévère plus la CRP est élevée (Koyanagi et al., 2004).

Par ailleurs, la protéine de liaison au rétinol (RBP: Retinol binding protein) est la principale protéine de transport qui achemine la vitamine A des réserves de foie vers les tissus périphériques. La production de RBP est largement réduite au cours de la RPA, ce qui a une incidence sur la concentration du rétinol dans le plasma (Quadro et al., 1999).

L'analyse de corrélation entre la concentration plasmatique du rétinol, la sévérité de la TB et l'âge des patients tuberculeux n'a révélé aucune différence significative. Contrairement, à l'étude de Pakasi et al. qui ont montré que la vitamine A était significativement plus basse dans les cas de tuberculose sévère par rapport aux cas de tuberculose légère (Pakasi et al., 2009). Cette divergence pourrait s'expliquer par l'absence de définition clinique consensuelle de TB grave / non grave.

Enfin, notre étude a montré que les patients tuberculeux présentent de faibles concentrations de rétinol plasmatique par rapport aux témoins sains. Compte tenu des données récentes rapportant que la vitamine A précisément l'acide rétinoïque all trans (ATRA: all trans Retinoïc Acid) favorise l'autophagie des macrophages infectés par *Mtb* et peut induire la maturation phagosome, ce qui permet ainsi de réduire la charge bactérienne dans les macrophages (Coleman et al., 2018). En outre, il a été rapporté que les macrophages alvéolaires humains et murins et les cellules dendritiques peuvent produire l'ATRA en oxydant le rétinol ou le rétinal pour réguler le cholestérol cellulaire (Coleman et al., 2013; Kim et al., 2019). En effet, les travaux intéressants de Wheelwright ont montré que la vitamine A induit une activité anti-*Mtb* avec la coopération de la protéine de transport NPC2 (NPC Intracellular cholesterol transport 2) en privant la bactérie du cholestérol (Wheelwright et al., 2014). Il semblerait donc, que les faibles concentrations en vitamine A peuvent être associées à un affaiblissement dans la capacité à inhiber l'infection mycobactérienne. Ainsi une carence en vitamine A pourrait être considérée comme un facteur de risque influençant le sort de l'infection à *Mtb*, le développement et la gravité de la maladie. Donc, une supplémentation en vitamine A pourrait être une stratégie potentielle pour augmenter l'immunité de l'hôte et améliorer l'efficacité du traitement.

Par ailleurs, nos données ont également révélé une discrimination sexuelle dans la carence en vitamine A. Les concentrations du rétinol étaient plus basses chez les hommes tuberculeux par rapport à leurs correspondants sains. La différence était fortement significative ($p < 0.0001$). Nos résultats rejoignent les données décrites dans la littérature rapportant que les hommes sont plus vulnérables à une carence en vitamine A que les femmes (Yadav, 2006; Darnton-Hill et al., 2005;

McLaren and Frigg, 2000; Sommer et al., 1996). Ceci pourrait être dû à des facteurs liés à la physiologie différente entre les femmes et les hommes (Adamu et al., 2017; Rezk et al., 2015; Baig-Ansari et al., 2008; Darnton-Hill et al., 2005). D'autre part, cette inégalité sexuelle peut être attribuée à l'influence des hormones sexuelles par analogie avec les données décrites sur les œstrogènes et la testostérone. En effet, il a été rapporté que les œstrogènes pourraient réguler le métabolisme de la vitamine D3 et l'expression de VDR (Nashold et al., 2009). Alors que l'administration de la testostérone pourrait améliorer l'absorption de la vitamine C (Sztanke et al., 2004).

D'autre part, nous avons stratifiés par âge nos données de vitamine A, vu l'impact de ce facteur sur le statut nutritionnel humain. Nos résultats rejoignent les données rapportées dans la littérature (Karyadi et al., 2000). En effet, la concentration en vitamine A était inférieure dans toutes les catégories d'âge des tuberculeux par rapport aux contrôles sains correspondants; constituant une preuve de plus sur la possibilité de considérer la carence en vitamine A comme un facteur de risque influençant le sort de l'infection à *Mtb*, le développement et la gravité de la maladie. Ainsi, la supplémentation en vitamine A pourrait être une stratégie potentielle pour augmenter l'immunité de l'hôte et améliorer l'efficacité du traitement.

La différence rapportée dans notre étude est moins nette chez les patients âgés de plus de 50 ans, ce qui pourrait être attribué à une diminution d'apport alimentaire et à une malnutrition récurrente chez les personnes âgées (Shakersain et al., 2016; Durán Alert et al., 2012).

Tout de même, nous notons que le présent travail est une étude préliminaire qui a évalué la concentration plasmatique du rétinol et ne renseigne pas sur les réserves hépatiques en vitamine A. Pour compléter ces résultats d'autres approches sont recommandées en utilisant la vitamine A marquée avec des isotopes stables (test de dilution au ^{13}C -rétinol) (Tanumihardjo, 2011).

Pour conclure, malgré les limites du modèle cas-témoin que nous avons choisi pour réaliser nos investigations comme la taille réduite d'échantillons et la difficulté de choisir les témoins non exposés à la maladie (Melamed and Robinson, 2019; Levin, 2006); nos résultats soulignent l'importance de la région chromosomique 8q12.1 dans la réponse immunitaire anti-TB et nous permettent de supposer que les gènes qui y sont localisés interagissent entre eux pour orchestrer plusieurs mécanismes de défense immunitaire anti-TB où la régulation des lipides et principalement le cholestérol et ses métabolites, pourrait constituer une facette importante de cette interaction et pourrait avoir une conséquence sur l'issue de l'interaction hôte-pathogène. Ainsi, considérons les résultats rapportés dans cette thèse et en se basant sur tous les arguments sus-cités, nous pouvons

proposer un scénario qui pourrait illustrer l'interaction hôte-pathogène en cas de résistance à la TB dans la population marocaine (figure 32).

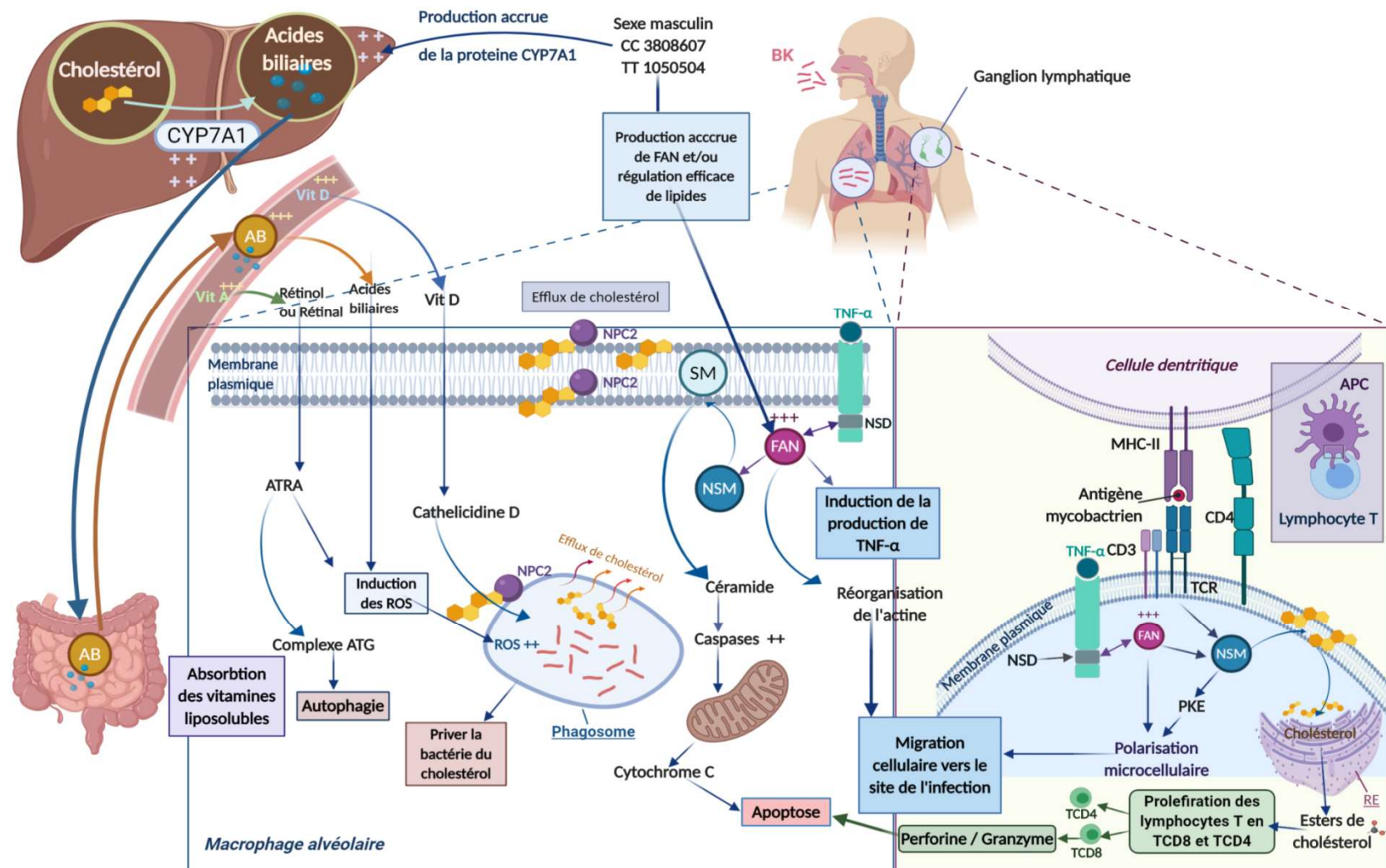


Figure 32 | Scénario proposé pour illustrer les mécanismes éventuels assurant la résistance à la TB chez les hommes marocains porteurs de l'allèle rs3808607-C et du génotype rs1050504TT.

L'individu du génotype TT rs1050504 (*NSMAF*) est porteur de l'allèle mutant qui induit une modification dans le site de reconnaissance du miARN 154-3p, ce qui pourrait diminuer la régulation de la transcription, conduisant théoriquement à une augmentation de la production de FAN. Cette production accrue du FAN pourrait améliorer la signalisation apoptotique pour se protéger contre la PTB et/ou probablement affecterait d'autres rôles que la protéine FAN joue dans la réponse immunitaire. FAN est impliquée dans la réorganisation de l'actine dans les macrophages, les leucocytes et les neutrophiles et donc dans la migration cellulaire en réponse à la signalisation chimiotactique. La protéine FAN induit la production du TNF- α . La FAN active les NSMs. Il est probable que le génotype TT pourrait influencer la réponse immunitaire de l'hôte en assurant une régulation optimale du NSM2; cette protéine régule les lipides de la membrane plasmique et l'homéostasie du cholestérol et joue un rôle important dans le transport du cholestérol de la membrane plasmique vers le réticulum endoplasmique et la production d'esters de cholestérol dont l'accumulation était essentielle pour soutenir la prolifération et la différenciation des lymphocytes T humaines en T CD4⁺ et TCD8⁺. L'homéostasie du cholestérol est régulée principalement par la voie CYP7A1 catabolisant le cholestérol en acides biliaires (AB). Les AB régulent l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et du glucose et sont impliqués l'absorption des vitamines liposolubles (vitamine A et D). L'activité antimicrobienne de la vitamine D est assurée par la production du peptide antimicrobien: la cathelicidine D. Alors que, la vitamine A (le rétinol ou le rétinol) est oxydée en ATRA qui favorise l'autophagie des macrophages infectés par *Mtb* et peut induire la maturation phagosome, ce qui permet ainsi de réduire la charge bactérienne dans les macrophages. Avec la coopération de la protéine de transport NPC2, l'ATRA peut réguler le cholestérol cellulaire dans les macrophages alvéolaires humains et murins; et les cellules dendritiques peuvent produire l'ATRA pour réduire le cholestérol cellulaire et d'en priver la bactérie. L'individu de génotype CC rs3808607 (*CYP7A1*) a une expression élevée du gène *CYP7A1* induisant une augmentation du catabolisme du cholestérol et par conséquent le cholestérol total plasmatique diminue ce qui probablement constitue un des facteurs qui le protège contre le développement de la TB. L'augmentation du catabolisme du cholestérol induit une production accrue des AB. Les AB sont capables de réduire la viabilité cellulaire en augmentant la production des espèces réactives oxygénées (ROS). Ils peuvent induire la migration cellulaire des fibroblastes pulmonaires vers le site de l'infection. Ces cellules permettent d'isoler la région infectée et de maintenir l'intégrité du granulome.

V Conclusions et perspectives

La TB est une maladie multifactorielle, où l'implication des facteurs génétiques prédisposant à la TB a été démontrée.

Cette thèse avait pour objectif général de contribuer à l'étude et la recherche de ces facteurs génétiques prédisposant à la TB.

Nous avons montré pour la première fois, une association génétique entre le variant rs3808607 situé dans la région promotrice du gène *CYP7A1* et la prédisposition à la TB. Il paraît que les individus ayant le génotype AA sont deux fois plus vulnérables à développer une TB. La prochaine étape consiste à valider ces résultats en les investiguant dans d'autres cohortes. Puis, par la suite, réaliser des explorations fonctionnelles des gènes *NSMAF* et *CYP7A1* dans le but de comprendre leur implication dans la TB.

En plus, nous avons validé par séquençage le génotypage réalisé par PCR-RFLP pour le rs3808607. Nos données ont révélé aussi, la présence probable de nouvelles mutations. Certes, ce sont des résultats préliminaires mais ils sont prometteurs. Dans nos futures investigations de la région promotrice du gène *CYP7A1*, il serait intéressant de prévoir l'augmentation de la taille des échantillons séquençés, en incluant des contrôles sains pour exploiter la pertinence de ces nouvelles mutations identifiées.

Nos travaux ont aussi permis d'identifier une nouvelle association génétique entre la prédisposition à la TB pulmonaire et le rs1050504, situé dans la région 3'UTR gène *NSMAF*. Nos données ont révélé que le génotype CT pourrait favoriser le risque de développer une TB pulmonaire, alors que le génotype TT semble jouer un rôle protecteur contre la TB. En outre, nous avons montré que lorsque le génotype AA rs3806607 et le génotype CT rs1050504 sont co-hérités, la susceptibilité à développer la TB est fortement significative (OR 13,5; $p = 0,0006$).

Nos résultats consolident le rôle de facteurs génétiques dans la prédisposition humaine à la TB. Il paraît que la TB chez les individus immunocompétents est une maladie polygénique liée aux mutations dans plusieurs gènes qui ont un effet cumulatif sur la susceptibilité à la maladie et est encore plus compliqué par des interactions gène-gène et gène-environnement.

La stratification selon le sexe, a révélé que l'association est maintenue uniquement chez les hommes, suggérant que le sexe masculin pourrait être considéré, comme facteur de risque pour développer une TB. Comprendre l'origine du sexisme pourrait orienter le traitement en permettant des systèmes de diagnostic et de traitement spécifiques au sexe. Ainsi, il serait intéressant de tester le rôle des gènes localisés sur le chromosome X, qui est susceptible d'influencer grandement la réponse immunitaire.

Par ailleurs, nous avons aussi montré que les patients tuberculeux présentent de faibles concentrations de rétinol plasmatique par rapport aux témoins sains. En plus, les concentrations du rétinol étaient plus basses chez les hommes tuberculeux par rapport à leurs correspondants sains. La différence était fortement significative ($p < 0.0001$), suggérant de considérer la faible concentration en vitamine A, comme un facteur de risque à développer une TB chez les hommes. Il est intéressant comme perspective d'évaluer les réserves hépatiques en vitamine A en utilisant d'autres approches comme la vitamine A marquée avec des isotopes stables. Ainsi, nous pourrions démontrer l'association entre la carence en vitamine A et le développement de la TB chez la population marocaine. Et par conséquent nous pourrions souligner l'importance de la supplémentation en vitamine A chez les tuberculeux que l'on pourrait recommander de l'intégrer dans le « programme national de lutte contre la TB » pour une prise en charge efficace et efficiente de la TB au Maroc. Enfin, des stratégies innovantes doivent être mise en place pour identifier les facteurs de risques et les gènes impliqués dans le contrôle génétique d'une maladie multifactorielle comme la TB. Dans ce contexte, l'apprentissage profond (ou *deep learning*, une forme d'Intelligence Artificielle), semble une méthode récente fort intéressante. Il s'agit d'un algorithme puissant que l'on peut entraîner et par la suite le confronter à de vastes bibliothèques de données préexistantes. Son usage semble particulièrement prometteur dans l'étude de la prédisposition génétique à la TB.

ANNEXE I

Consentement éclairé

Nom :

Prénom :

Date de naissance :

Le projet de recherche intitulé:.....
.....
....., m'a été proposé pour participation.

Aussi, je confirme que j'ai eu connaissance de l'ensemble du projet de recherche sujet à ce consentement :

- ✓ L'objectif et la méthodologie des expérimentations nécessaires.
- ✓ L'avis favorable du comité d'éthique.
- ✓ La participation volontaire à cette étude. En effet, je peux à tout moment retirer mon accord de participation à cette étude sans avoir à donner de raisons.
- ✓ Toutes les informations qui me concernent vont rester secrètes.
- ✓ J'ai reçu un résumé écrit du projet de recherche avec tous les détails.
- ✓ J'accepte que toutes les informations enregistrées durant cette étude soient exploitées par les chercheurs et soient publiées dans des revues scientifiques.

Après avoir eu réponse à toutes mes questions, j'accepte la participation dans cette étude.

La date et la signature de la personne
donnant son consentement*:

La date et la signature de
l'investigateur:

(*) Une copie à donner à la personne volontaire

ANNEXE II

IMMGEN : Etude génomique et immunologique de la tuberculose dans la population marocaine

a) Questionnaire « patient »

A. VERIFICATION DES CRITERES D'ELIGIBILITE DU SUJET

CRITERES D'INCLUSION

Item		OUI	NON
1	Age $\geq$ 18 ans	☐	☐
2	Nouveau cas de tuberculose documenté ou fortement suspecté	☐	☐
3	Consentement éclairé	☐	☐

SI UN SEUL "NON", NE PAS INCLURE

CRITERES DE NON INCLUSION

Item		OUI	NON
1	Patients atteint d'une des maladies chroniques suivantes : ▪ Insuffisance hépato-cellulaire ▪ Insuffisance rénale ▪ Insuffisance cardiaque ▪ Maladie néoplasique ▪ Diabète (DNID et DID)	☐	☐
2	Sujet ayant été sous corticothérapie au cours des 3 derniers mois	☐	☐
3	Sujet ayant été sous immunosuppresseurs au cours des 6 derniers mois	☐	☐
4	Sujet ayant effectué un test IDR au cours des 6 derniers mois	☐	☐
5	Patients actuellement sous antibacillaires	☐	☐

SI UN SEUL "OUI", NE PAS INCLURE

Date de recrutement : |_|_|_|_| 2011

Date d'obtention du consentement éclairé : |_|_|_|_| 2011

Date de prélèvement : |_|_|_|_| 2011

B. PROFIL DU SUJET

☐ Tuberculose Pulmonaire

Si oui, précisez : ☐ TPM+
☐ TPM0

☐ Tuberculose Pleurale

☐ Tuberculose Pulmonaire associée à une Tuberculose Extra-Pulmonaire

☐ Pleurésie non tuberculeuse

Sous-étude familiale*

Veuillez cocher les cases correspondantes :

Item		OUI	NON
1	Existence chez le cas index d'au moins un autre cas de tuberculose documenté de parenté du 1 ^{er} degré ¹ Acceptant de participer à l'étude.	☐	☐
2	Au moins 3 parmi les autres membres sains de la famille ² acceptant de participer à l'étude.	☐	☐

*Ne concerne pas les pleurésies non tuberculeuses

Si « **Oui** » aux **2 items**, préciser le lien de parenté de chaque sujet participant :

☐ cas de tuberculose documentés :

☐ Parent

☐ Enfant

☐ les autres membres sains de la famille du cas index:

☐ Parent

☐ Frères/Sœurs

Nombre de personnes : |_|_|personnes

Attention : Pour chaque sujet participant, faire signer le formulaire de consentement en 2 exemplaires et compléter le questionnaire correspondant.

C. CARACTERISTIQUES SOCIO- DEMOGRAPHIQUES

Sexe

☐ Masculin

☐ Féminin

Age

|_|_| ans

¹ 1^{er} degré: Parents ou enfants du cas index.

² Membres sains de la famille du cas index : Parents, frères et sœurs

Origine ethnique

(plusieurs réponses possibles)

- ☐ Arabe
- ☐ Rifi
- ☐ Soussi
- ☐ Amazigh
- ☐ Sahraoui
- ☐ Autres; précisez :

Situation de famille

- ☐ Marié(e)
- ☐ Célibataire
- ☐ Veuf (ve)
- ☐ Séparé(e)

Niveau d'éducation

- ☐ Lettré
- ☐ Illétré
- ☐ Coranique
- ☐ Primaire
- ☐ Secondaire
- ☐ Universitaires

Lieu de résidence

- ☐ Milieu urbain (>20 000 habitants)
- ☐ Milieu rural (< 2 000 habitants)
- ☐ Milieu semi-urbain (<20 000 habitants)

Habitation

- ☐ Type formel
- ☐ Type informel ; précisez : ☐ En dur ☐ Baraque

Nombre de chambre par habitation |_|_|

Situation professionnelle

- En activité : ☐ Oui ☐ Non
- Si **Oui** ☐ régulière ☐ Irrégulière
- Précisez :

Revenue mensuel

- ☐ < SMIG
- ☐ SMIG
- ☐ > SMIG
- ☐ Autre ; Précisez :

D. ANTECEDENTS FAMILIAUX ET PERSONNELS

Notion de contag tuberculeux

- ☐ Oui
- ☐ Non
- ☐ Ne sait pas

Si **Oui**, précisez ci-dessous :

- ☐ Familial

☐ Professionnel

☐ Scolaire

Vaccination du BCG

☐ Oui

☐ Non

☐ Ne sait pas

Si **Oui**, précisez ci-dessous :

☐ Cicatrice vaccinale

☐ Vaccination documentée

Consanguinité des parents

☐ Oui

☐ Non

Le sujet présente-t-il actuellement d'autres pathologies associées ?

☐ Oui

☐ Non

Si **Oui**, précisez dans le tableau ci-dessous :

Pathologie	Année de survenue	Traitements en cours
	_ _ _ _	
	_ _ _ _	
	_ _ _ _	

Est-ce qu'un (des) membre(s) de la famille du sujet présente (ent) t-il(s) une (des) pathologie(s) chronique(s) ?

☐ Oui

☐ Non

Si **Oui**, complétez le tableau ci-dessous :

Pathologie	Année de survenue	Lien de parenté
	_ _ _ _	
	_ _ _ _	
	_ _ _ _	

Habitudes tabagiques et autres addictions

6.1. Tabagisme

☐ Oui

☐ Non

Si **Oui**, combien d'années au total a-t-il fumé de cigarette au quotidien ? |_|_| années

Si **Oui**, combien de cigarettes en moyenne a-t-il fumé / par jour ? |_|_| cigarettes par jour

6.2. Consommation de boissons alcoolisées

☐ Oui

☐ Non

Si **Oui**, précisez ci-dessous :

☐ Quotidiennement

☐ Au moins une fois par semaine

☐ Au moins une fois par mois

☐ Moins souvent

6.3. Consommation de drogues

☐ Oui ☐ Non

Si **Oui**, précisez ci-dessous :

Le(s)quelle(s) :

- ☐ Quotidiennement
- ☐ Au moins une fois par semaine
- ☐ Au moins une fois par mois
- ☐ Moins souvent

Antécédent carcéral

☐ Oui ☐ Non

E. HISTOIRE DE LA TUBERCULOSE*

**Ne pas compléter dans le cas d'une pleurésie non tuberculeuse*

Date des premiers symptômes : |_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

Date de diagnostic : |_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

Signes évocateurs

- ☐ Toux
- ☐ Expectoration
- ☐ Dyspnée
- ☐ Hémoptysie
- ☐ Fièvre
- ☐ Amaigrissement ; nombre de kilos perdus : |_|_| kg

Signes de gravité

☐ Présence ☐ Absence

Si **présence**, précisez ci-dessous :

- ☐ Tuberculose Pulmonaire
 - ☐ Milliaire
 - ☐ Broncho Pneumonie
 - ☐ Pneumonie casseuse
 - ☐ Diffuse et bilatérale
- ☐ Tuberculose Extra Pulmonaire
 - ☐ Multifocale
 - ☐ Hématologique
 - ☐ Autres ; *précisez*.....

Examen physique

Pleuro – Pulmonaire :

- ☐ Normal
- ☐ Anormal ; *précisez*.....

Extra – pulmonaire :

☐ Normal

☐ Anormal ; *précisez*.....

Examens radiologiques

Radio photo ☐ Oui

☐ Non

Radio Thorax ☐ Oui

☐ Non

Si **Oui**, précisez ci-dessous :

Date d'examen :

Résultat : ☐ Normal

☐ Anormal

Si résultat anormal, précisez ci-dessous les sièges et types des lésions :

Siège des lésions :

☐ LSD

☐ LM

☐ LID

☐ LSG

☐ LIG

Type des lésions :

☐ Cavité ; *précisez le nombre*

☐ Infiltration

☐ Nodule

☐ Epanchement pleural

☐ Autres; *précisez*.....

Prise de traitements concomitants (*hors antibacillaires*)

☐ Oui

☐ Non

Si **Oui**, complétez le tableau ci-dessous :

Nom médicament (DCI)	Date de première prise	Durée (jours)

1. Recours aux soins

Accessibilité aux soins :

☐ oui

☐ Non

Satisfaction du service offert par le centre :

☐ oui

☐ Non

Offre de soins psychiatriques :

☐ oui

☐ Non

Délai entre le début des symptômes et la prise en charge : jours

2. Connaissances liées à la tuberculose

Connaissance du sujet sur la maladie ? ☐ Oui ☐ Non

Connaissance du sujet sur son mode de transmission ? ☐ Oui ☐ Non

Connaissance du sujet sur les symptômes de la tuberculose ? ☐ Oui ☐ Non

Si au moins 1 **Oui**, précisez la (les) source(s) d'information :

- ☐ Ecole
- ☐ Médias
- ☐ Affiches publicitaires
- ☐ Professionnels de santé
- ☐ Autres

F. EXAMENS DANS LE CADRE DE L'ETUDE

Examen	Oui	Non	Date de réalisation	Lieu de réalisation	Résultat
IDR	☐	☐	_ _ _ _ _ _ _ _ _	☐ CDTMR ☐ Hôpital ☐ INH	☐ Négatif ☐ Positif ; précisez diamètre :(mm)
Examen de Culture du BK* (TPM+ , TPM0)	☐	☐	_ _ _ _ _ _ _ _ _	☐ CDTMR ☐ Hôpital ☐ INH	☐ Absence de colonies ☐ Présence de colonies Nombre de colonies par tube :.....
Examen de Bascilloscopie	☐	☐	_ _ _ _ _ _ _ _ _	☐ CDTMR ☐ Hôpital ☐ INH	☐ Absence de BAAR (0 par 300 champs) ☐ Présence BAAR : ☐ 1-10 par 100 champs ☐ 1-10 par 10 champs ☐ 1-10 par champs ☐ >10 par champs
Examen anatomo-pathologique sur Biopsie pleurale (si T.Pleurale)	☐	☐	_ _ _ _ _ _ _ _ _	☐ CDTMR ☐ Hôpital ☐ INH ☐ Autre	Localisation de la biopsie :..... ☐ Granulome ☐ Caséum ☐ Autres ; précisez :.....

G. AUTRES EXAMENS COMPLEMENTAIRES

Examen	Oui	Non	Date de réalisation	Lieu de réalisation	Résultat
Sérologie HIV	☐	☐	_ _ _ _ _ _ _	☐ CDTMR ☐ Hôpital ☐ INH ☐ Autre	☐ Négatif ☐ Positif
NFS	☐	☐	_ _ _ _ _ _ _	☐ CDTMR ☐ Hôpital ☐ INH ☐ Autre	☐ Normale ☐ Anormale ; précisez :
Autres	☐	☐	_ _ _ _ _ _ _	☐ CDTMR ☐ Hôpital ☐ INH ☐ Autre	

Nom du médecin :

Cachet :

ANNEXE III

IMMGEN : Etude génomique et immunologique de la tuberculose dans la population marocaine

b) Questionnaire « sujet sain non exposé »

A. VERIFICATION DES CRITERES D'ELIGIBILITE DU SUJET

CRITERES D'INCLUSION

Item		OUI	NON
1	Age $\geq$ 18 ans	☐	☐
2	Sujet volontaire sain	☐	☐
3	Consentement éclairé	☐	☐

SI UN SEUL "NON", NE PAS INCLURE

CRITERES DE NON INCLUSION

Item		OUI	NON
1	Patients atteint d'une quelconque maladie chronique ou aigue	☐	☐
2	Sujet en contact étroit avec un cas de tuberculose active	☐	☐
3	Sujet ayant un antécédent familial de tuberculose	☐	☐
4	Sujet ayant été sous immunosuppresseurs au cours des 6 derniers mois	☐	☐
5	Sujet ayant effectué un test IDR au cours des 6 derniers mois	☐	☐

SI UN SEUL "OUI", NE PAS INCLURE

Date de recrutement : |_|_|_|_| 2011

Date d'obtention du consentement éclairé : |_|_|_|_| 2011

Date de prélèvement : |_|_|_|_| 2011

B. CARACTERISTIQUES SOCIO- DEMOGRAPHIQUES

Sexe

☐ Masculin ☐ Féminin

Age

|_|_| ans

Origine ethnique

(plusieurs réponses possibles)

- ☐ Arabe
☐ Rifi
☐ Soussi
☐ Amazigh
☐ Sahraoui
☐ Autres; *précisez* :

Situation de famille

- ☐ Marié(e) ☐ Veuf(ve)
☐ Célibataire ☐ Séparé(e)

Niveau d'éducation :

- ☐ Lettré ☐ Illétré
☐ Coranique
☐ Primaire
☐ Secondaire
☐ Universitaires

Lieu de résidence

- ☐ Milieu urbain (>20 000 habitants)
☐ Milieu rural (< 2 000 habitants)
☐ Milieu semi-urbain (<20 000 habitants)

Habitation :

- ☐ Type formel
☐ Type informel ; *précisez* : ☐ En dur ☐ Baraque

Nombre de chambre par habitation |_|_|

Situation professionnelle

- En activité : ☐ Oui ☐ Non
Si **Oui** ☐ régulière ☐ Irrégulière
Précisez :

Revenue mensuel :

☐ < SMIG ☐ SMIG ☐ > SMIG ☐ Autre ; Précisez :.....

C. ANTECEDENTS FAMILIAUX ET PERSONNELS

Vaccination du BCG

☐ Oui ☐ Non ☐ Ne sait pas

Si **Oui**, précisez ci-dessous :

- ☐ Cicatrice vaccinale
☐ Vaccination documentée

Consanguinité des parents

☐ Oui ☐ Non

Est-ce qu'un (des) membre(s) de la famille du sujet présente (ent) t-il(s) une (des) pathologie(s) chronique(s) ?

☐ Oui ☐ Non

Si **Oui**, complétez le tableau ci-dessous :

Pathologie	Année de survenue	Lien de parenté
	_ _ _ _	
	_ _ _ _	
	_ _ _ _	

Habitudes tabagiques et autres addictions

4.1. Tabagisme

☐ Oui ☐ Non

Si **Oui**, combien d'années au total a-t-il fumé de cigarette au quotidien ? |_|_| années

Si **Oui**, combien de cigarettes en moyenne a-t-il fumé / par jour ? |_|_| cigarettes par jour

4.2. Consommation de boissons alcoolisées

☐ Oui ☐ Non

Si **Oui**, précisez ci-dessous :

- ☐ Quotidiennement
☐ Au moins une fois par semaine
☐ Au moins une fois par mois
☐ Moins souvent

4.3. Consommation de drogues

☐ Oui ☐ Non

Si **Oui**, précisez ci-dessous :

Le(s)quelle(s) :

- ☐ Quotidiennement
- ☐ Au moins une fois par semaine
- ☐ Au moins une fois par mois
- ☐ Moins souvent

Antécédent carcéral

☐ Oui ☐ Non

Connaissances liées à la tuberculose

Connaissance du sujet sur la maladie ? ☐ Oui ☐ Non

Connaissance du sujet sur son mode de transmission ? ☐ Oui ☐ Non

Connaissance du sujet sur les symptômes de la tuberculose ? ☐ Oui ☐ Non

Si au moins 1 **Oui**, précisez la (les) source(s) d'information :

- ☐ Ecole
- ☐ Médias
- ☐ Affiches publicitaires
- ☐ Professionnels de santé
- ☐ Autres

Accessibilité aux soins

☐ Oui ☐ Non

F. EXAMENS DANS LE CADRE DE L'ETUDE

Examen	Oui	Non	Date de réalisation	Lieu de réalisation	Résultat
IDR	☐	☐	_ _ _ _ _ _ _	☐ CDTMR ☐ Hôpital ☐ INH	☐ Négatif ☐ Positif ; précisez diamètre : (mm)

Nom du médecin :

Cachet :

ANNEXE IV

Extraction de l'ADN génomique

Principe:

L'ADN est extrait du sang total par un procédé utilisant une membrane en silice (colonne), à laquelle l'ADN est adsorbé par affinité de charge après une première étape de lyse en présence de la protéase K. Cette étape permet de libérer les acides nucléiques et dénaturer les protéines. Ces dernières sont ensuite éliminées par plusieurs lavages et centrifugations des colonnes. L'ADN est finalement élué de la membrane et conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

Procédure analytique:

L'extraction commence par la préparation des réactifs: Qiagen protease, Tampon AW1, Tampon AW2 selon les recommandations du kit. Par la suite, 500 μl de Qiagen Protease est déposée dans le tube de centrifugation de 50 ml, à laquelle 5-10 ml du sang est ajoutée puis homogénéisée par flux et reflux. Ensuite, 12 ml du tampon AL est ajouté, puis mélangé par inversement du tube 15 fois environ. Le tube est incubé 10 min à 70°C . Une fois récupéré 10 ml d'Ethanol (96-100 %) est ajouté. Le tube est mélangé par inversement 10 fois environ. La moitié du lysat est transféré délicatement sur Qiamaxi Column placée dans un tube de centrifugation de 50 ml. Après centrifugation à 1850 g pendant 3 min, le filtrat est jeté et un nouveau tube est utilisé. Le reste du lysat est transféré de même sur Qiamaxi Column, puis centrifugé à 1850 g pendant 3 min. La colonne est ensuite lavée en ajoutant 5 ml du tampon AW1 puis centrifugé à 4500 g pendant 1 min. Un 2ème lavage est réalisé en ajoutant 5 ml du tampon AW2. Le tube est centrifugé à 4500 g pendant 15 min. La colonne est placée dans un nouveau tube de 50 ml à laquelle 1 ml du AE est ajouté délicatement sans toucher les bords le tout est incubé 5 min à T° ambiante puis centrifugé à 4500 g pendant 2 min. L'éluat récupéré est ensuite remis dans la Qiamaxi Column, incubé à T° ambiante pendant 5 min puis centrifugé 4500 g à 5 min (figure 33).

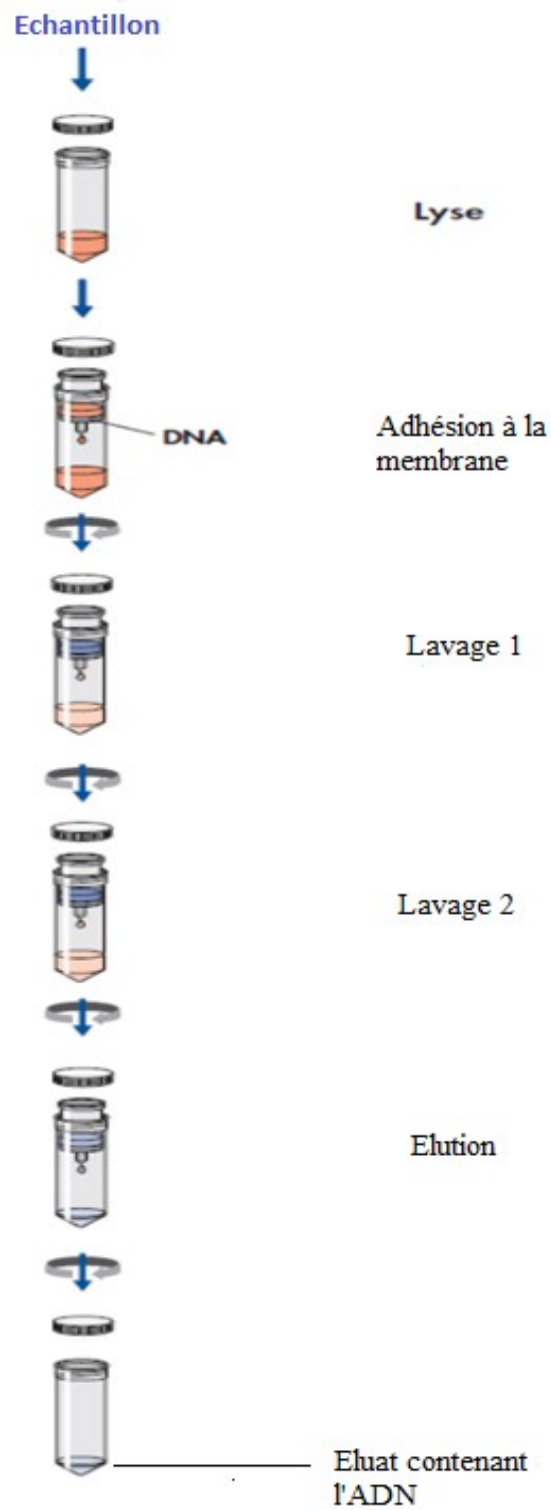


Figure 33 | Procédure d'extraction d'ADN par QIAamp® DNA Blood Maxi (QiagenGmbH, Hilden, Allemagne).

ANNEXE V

Génotypage par hydrolyse de sondes fluorescentes TaqMan® MGB

Principe:

C'est une technique de PCR en temps réel qui permet de réaliser des "typages alléliques" nommée aussi "discrimination allélique" grâce à l'activité 5'exonuclease de l'ADN polymérase, qui hydrolyse une sonde hybridée à la séquence cible. La sonde utilisée est une TaqMan®MGB (Minor Groove Binder) marquée à l'extrémité 5' avec un fluorophore qui peut être FAM pour l'allèle sauvage et VIC ou autre pour l'allèle muté (figure 34). L'extrémité 3'est marquée par un quencher non fluorescent (NFQ) auquel une molécule marquée MGB (minor groove binder) est accrochée, cette structure moléculaire (MGB) permet aux sondes TaqMan® de s'insérer dans les petits sillons de l'ADN, ce qui peut considérablement améliorer la sensibilité et la spécificité de la technique.

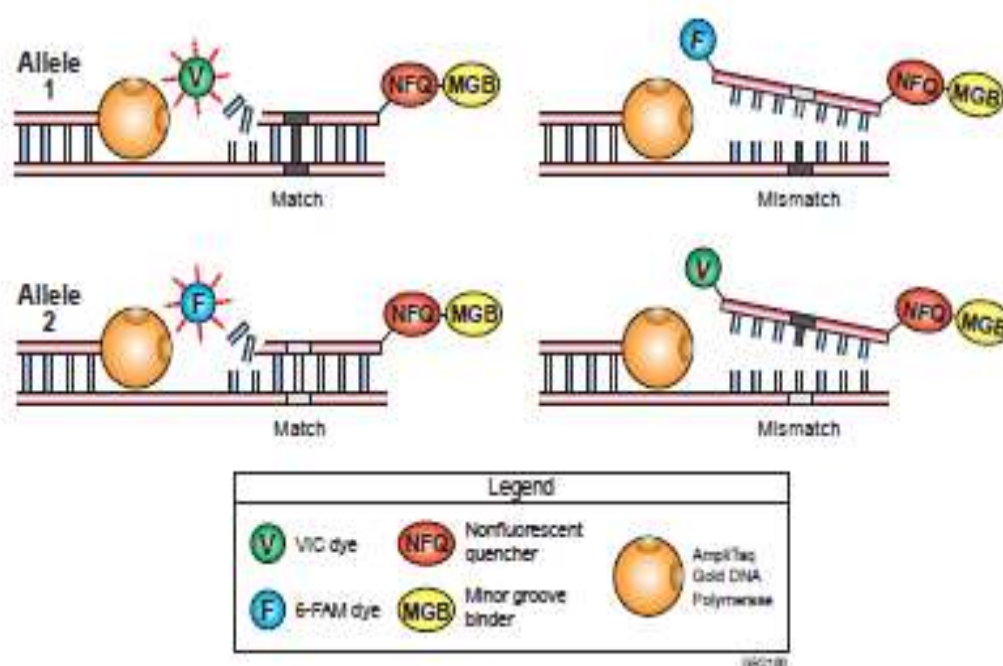


Figure 34 | Principe de la discrimination allélique par TaqMan®

Chaque sonde TaqMan MGB s'apparie spécifiquement à sa séquence complémentaire entre les sites des amorces sens et anti-sens. L'ADN polymérase étend les amorces liées à l'ADN génomique, puis elle clive les sondes qui sont hybridées à la séquence cible. Ainsi, le quencher est séparé du reporter ce qui provoque une émission de fluorescence. L'analyse du signal de fluorescence généré par la PCR indique lequel des allèles est présent au niveau de l'échantillon.

Current immunogenetic predisposition to tuberculosis in the Moroccan population

M. Qrafl¹ | M. Najimi² | R. Elaouad³ | K. Sadki¹ 

¹Physiopathology Team, Immunogenomic and Bioinformatic Unit, Faculty of Sciences, Genomic Center of Human Pathologies, Mohammed V University, Rabat, Morocco

²Laboratory of Pediatric Hepatology and Cell Therapy, Institut de Recherche Expérimentale et Clinique (IREC), Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium

³School of Medicine and Pharmacy Sciences, Mohammed V University of Rabat, Rabat, Morocco

Correspondence

Khalid Sadki, Physiopathology Team, Immunogenomic and Bioinformatic Unit, Faculty of Sciences, Genomic Center of Human Pathologies, Mohammed V University, Rabat, Morocco.
Email: khalidsadki1@gmail.com

Funding information

The work was funded by departmental resources

Summary

Tuberculosis (TB) is a serious infectious disease that kills approximately two million people per year, particularly in low- and middle-income countries. Numerous genetic epidemiology studies have been conducted of many ethnic groups worldwide and have highlighted the critical impact of the genetic environment on TB distribution. Many candidate genes associated with resistance or susceptibility to TB have been identified. In Morocco, where TB is still a major public health problem, various observations of clinical, microbiological and incidence distribution are heavily affected by genetic background and external environment. Morocco has almost the same clinical profile as do other North African countries, mainly the increase in more extrapulmonary than pulmonary forms of the diseases, when compared to European, Asian or American populations. In addition, a linkage analysis study that examined Moroccan TB patients identified a unique chromosome region that had a strong association with the risk of contracting TB. Other genes in the Moroccan population that were found to be associated seem to be involved predominantly in modulating the innate immunity. In this review, we appraise the major candidate genes that have been reported in Moroccan immunogenetic studies and discuss their updated role in TB, particularly during the first phase of the immune response to *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) infection.

KEYWORDS

immunogenetic, Moroccan, tuberculosis

1 | INTRODUCTION

TB is an infectious disease caused by Mtb. It is still a major public health problem and is a real challenge to medical progress. According to the latest report published by the World Health Organization, it is that an estimated 9.6 million new TB cases were detected and that 1.5 million patients died from this pathology (1.1 million HIV-negative and 0.4 million HIV-positive people). Around 28% of these numbers occurred in African countries, which also had the highest rates of cases and deaths (WHO, 2015).

In Morocco, 27,745 new cases of all forms of the disease (82 cases per 100,000 inhabitants) were registered in 2014 (<http://www.sante.gov.ma/pages/actualites.aspx?idactu=142>). This number is distributed

unequally in different regions of the kingdom (Figure 1). Approximately 60% of the total number identified was distributed across five regions, namely Grand Casablanca, Tangier-Tétouan, Fès-Boulemane, Rabat-Salé-Zemmour-Zaër, Gharb-Chrarda-Beni-Hssen and Souss-Massa-Drâa. According to the recent report by the Moroccan Ministry of Health, it seems that the overall incidence, as well as that of sputum smear-positive pulmonary TB, decreased 30% and 35%, respectively, during the last 8 years (1996–2014) (<http://www.sante.gov.ma/Documents/tuber-Fr.jpg>).

However, the report draws attention to the greater extrapulmonary frequency (46.2%) compared to sputum smear-positive pulmonary TB frequency (43.2%), sputum smear-negative pulmonary TB frequency (9.2%) and TB primo infection (1.4%). A high number of

TB incidence by region, Morocco 2014

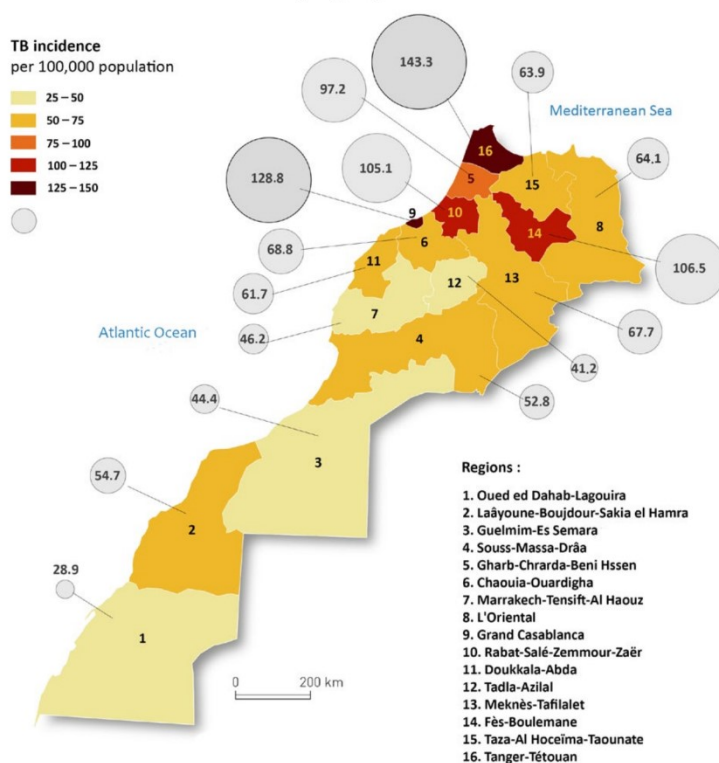


FIGURE 1 Tuberculosis incidence by region, Morocco, 2014 (cases per 100,000)

extrapulmonary cases is also observed in Tunisian and Algerian populations, which could share some environmental and genetic factors (WHO, 2015). By contrast, in 2013, European countries reported that, of the 64,844 TB patients, 70.5% and 22.3% had pulmonary and extrapulmonary TB, respectively (WHO, 2014). The major complication regarding TB is the increasing frequency of HIV co-infection worldwide. In fact, co-infected patients are 29 times more likely to develop TB disease than are those who are HIV-negative (WHO, 2015).

It is interesting that the documented epidemiological data highlight that the divergence of national geographical TB dissemination may be due to the Moroccan population's genetic diversity at an ethnic level. In this context, it has been reported that the Moroccan Berber populations occupy an intermediate position between European and sub-Saharan populations (Coudray et al., 2009). In addition, the most likely common TB clinical profile observed in North African populations could suggest the presence of a common genetic background. A recent study published by our Tunisians colleagues reported a close genetic diversity among North African populations (Cherni et al., 2016). Based on the historical period, the authors of this study and others (as reported by Henn and his colleagues) emphasized the distinctive genetic diversity compared to other populations from Europe, sub-Saharan Africa and south-west Asia (Cherni et al., 2016; Henn et al., 2012).

Apart from the effect that environmental factors could play, the genetic background plays a crucial role in terms of susceptibility or resistance to TB. There is convincing evidence that a host of genetic factors contributes to the outcome of TB. Studies of twins support this conclusion, and the data reported show a higher concordance rate in monozygotic twins than in dizygotic twins (Jepson et al., 2001; Kallmann & Reisner, 1943). Furthermore, only 5–10% of infected people have a high risk of developing active TB during their lifetime, while the majority of individuals are naturally resistant to TB. To date, numerous research groups have published hundreds of articles focusing on the genetic predisposition to TB. Family and case/control studies, using different statistical models such as genomewide linkage studies or genomewide association studies, have been used (Bellamy et al., 2000; Cobat, Orlova, Barrera, & Schurr, 2013; Meyer & Thye, 2014; Thye et al., 2010). As a result of these great efforts, several genes have been identified as being associated with susceptibility or resistance to TB (Table 1).

Some of those genes seem to play a key role in the pathogenesis of TB, as revealed in different ethnic populations, and include HLA (human leucocyte antigen), CD209, vitamin D receptors, PTPN22, TLR, cytokine and receptor genes (gamma interferon, interleukins 10, 12, 17) (Kettaneh et al., 2006; Lamsyah et al., 2009; Liang, Guo, Li, & Kong, 2014; Liu et al., 2004; Oral et al., 2006; Schurz, Daya, Möller, Hoal, & Salie, 2015; Selvaraj et al., 2008). Other genes have been shown to

TABLE 1 Genetic associations of important gene variants with susceptibility or resistance to tuberculosis

Genes	Genotype/Allele	Association with TB	Population	p-value	OR (95% CI)	References
HLA genes						
	DRB1*1202	Pos	Indonesians	.0008	0.32 (0.16–0.64)	Yuliwandari et al. (2010)
	DQB1*0601	Neg	Indians	.008	2.32 (1.29–4.27)	Ravikumar et al. (1999)
Receptors						
	NRAMP1 (SLC11A1)					
	INT4 G/C	Pos	West Africans	.009	1.83 (1.22–2.75)	Bellamy et al. (1998)
	3'UTR	Pos	West Africans	<.001	1.85 (1.35–2.54)	Bellamy et al. (1998)
			Koreans	.02	1.845 (1.097–3.104)	Ryu et al. (2000)
			Chinese Han	.03	1.89 (1.171–3.051)	Liu et al. (2004)
	D543N	Pos	West Africans	.008	1.85 (1.20–2.85)	Bellamy et al. (1998)
			Chinese Han	.041	2.59 (1.043–6.434)	Liu et al. (2004)
			Tunisians	.003*	1.85 (1.2–2.88)	Ben-Selma et al. (2012)
CD209 (DC-SIGN)	–336G	Pos	South Africans	.01	1.48 (1.08–2.02)	Barreiro et al. (2006)
			Sub-Saharan Africa	.006	0.86 (0.77–0.96)	Vannberg et al. (2008)
	–871A	Pos	South Africans	8.2×10^{-4}	1.85 (1.29–2.66)	Barreiro et al. (2006)
VDR	Fok T/C (rs10735810)	Pos	Chinese Han	.002	2.345 (1.222–4.499)	Liu et al. (2004)
	Taq C/T (rs731236)	Neg	Gambians	.01	0.53 (0.31–0.88)	Bellamy et al. (1999)
	Bsm A/G (rs1544410)	Pos	Turks	.000	1.61 (1.23–2.11)	Ates et al. (2011)
TLR2	Arg753Glu	Pos	Turks	.019	5.55 (1.68–18.34)	Ogus et al. (2004)
	Arg677Trp	Pos	Tunisians	<.001	—	Ben-Ali et al. (2004)
Cytokines & chemokines						
IFN- γ	+874A	Pos	South Africans	.0055	1.64 (1.16–2.30)	Rossouw, Nel, Cooke, van Heiden, and Hoal (2003)
			Brazilians	<.0001	1.64–3.22	Vallinoto et al. (2010)
TNF- α	–238GG	Pos	Iranians	.0009	1.70 (5.45–19.34)	Amirzargar et al. (2006)
	–857 C/T	Neg	Chinese	.001	0.68 (0.53–0.86)	Ma et al. (2010)
MIF	–173 C	Pos	Colombians	.02	1.64 (1.07–2.52)	Gómez et al. (2007)
			Iranians	.028	1.63 (1.07–2.48)	Hashemi et al. (2015)
			South-western Chinese	<.001	2.12 (1.45–3.10)	Li et al. (2012)
IL-12	P40 intron 2-repeat marker (ATT) ₈	Pos	Hong Kong Chinese	<.001	2.14 (1.45–3.19)	Tso, Lau, Tam, Wong, and Chiang (2004)
MCP-1(CCL2)	–2581G (alias: –2518A/G; rs1024611)	Pos	Mexicans	.0026	2.45 (1.88–3.19)	Flores-Villanueva et al. (2005)
			Koreans	.0001	2.63 (1.85–3.73)	Thye et al. (2009)
			Ghanians	.0002	0.81 (0.73–0.91)	
	–362C	Neg	Ghanians	.000019	0.83 (0.76–0.90)	Thye et al. (2009)
Enzymes						
PTPN22	1858T	Neg	Colombians	.04	0.3 (0.08–1.04)	Gomez et al. (2005)
MBL	G875A Exon1	Pos	Indians	.02	3.85 (1.66–8.88)	Vaid et al. (2006)
	G57D Exon1	Neg	Gambians	.037	0.79 (0.64–0.99)	Bellamy et al. (1998)

*pc, Bonferroni correction; Pos, positive; Neg, negative.

be more common in patients with latent or active TB, as revealed at the transcriptomic level (von Both, Kaforou, Levin, & Newton, 2015; Joosten et al., 2012). In fact, many meta-analysis studies have reported convincing data about some candidate markers for susceptibility to TB (Lee & Song, 2015; Liang et al., 2014; Tong et al., 2015).

In the Moroccan population, several genetic studies have been conducted in order to appraise the impact of polymorphisms on TB susceptibility or resistance, while acknowledging that the genetic associations observed are sometimes different among populations.

As cited below, Moroccan epidemiological data revealed that there is a difference in TB incidence by regions. There are regions with higher TB incidence reaching 143.3 per 100,000 habitants. According to the last census data reported by the Moroccan High Commissioner of planning, these areas are the most peopled in Morocco. Inversely, the regions with low TB incidence have the lowest population density (http://www.hcp.ma/Repartition-geographique-de-la-population-d-apres-les-donnees-du-Recensement-General-de-la-Population-et-de-l-Habitat-de_a1796.html). Once again, this underlines the importance to take into consideration the overcrowding as a potential risk factor increasing the likelihood of exposure to Mtb and progression to disease (Kirenga et al., 2015; Narasimhan, Wood, MacIntyre, & Mathai, 2013; Srivastava, Kant, & Verma, 2015).

It would appear that difference observed in the geographical distribution of TB incidence by regions is linked to environmental factors. But it does not mean that genetic background is not implicated in this difference. It would have been very rewarding to review that in this study; unfortunately, all TB genetic studies are done in Moroccan patients recruited from two nearby cities: Casablanca and Rabat, where there is a strong admixture between all ethnic populations. Further studies are highly recommended to evaluate if the genetic background affects directly TB incidence in these regions.

The current review discusses all the relevant genetic data that have been documented with regard to the Moroccan TB population. We also review the potential implications of some of the candidate genes via a literature review.

2 | CANDIDATE GENES AND THE RISK OF DEVELOPING TB

In this section, we principally discuss the potential effects of all the candidate genes that have been found to be associated with TB in the Moroccan population and those which could play a role in the development of TB. We propose to discuss each gene by taking its role in immune response into consideration from the first stage of becoming infected with Mtb (Figure 2).

2.1 | Dendritic Cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin: DC-SIGN/CD209

In 2003, Tailleux et al. were the first to report the identification of a new major Mtb receptor in human dendritic cells, namely the DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM3-grabbing nonintegrin).

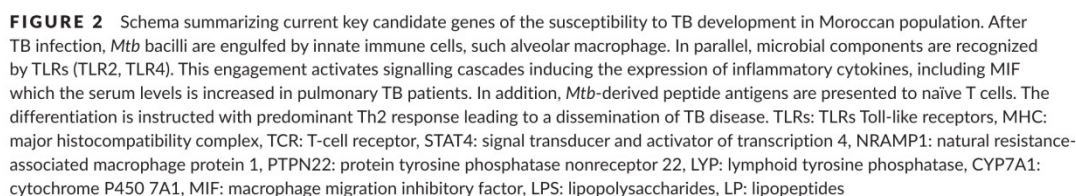
DC-SIGN binds mannosylated lipoarabinomannan (ManLAM), thus permitting Mtb entry into human DCs (Geijtenbeek et al., 2000). Additional important roles in immune responses have been attributed to DC-SIGN receptors, such as the ability to suppress Toll-like receptor signalling and the subsequent modulation of cytokine production (Geijtenbeek et al., 2003; van Kooyk & Geijtenbeek, 2003; Tailleux et al., 2003). This receptor is encoded by the CD209 gene, which is located on human chromosome 19p13.3, spanning approximately 13 kb and comprising seven exons and six introns (Barreiro et al., 2006; Soilleux, Barten, & Trowsdale, 2000). Subsequently, several authors have studied the impact of the polymorphism of CD209 gene on the development of TB.

The most extensively investigated relevant polymorphisms were CD209 -336A/G and -871A/G. A case-control study conducted by Sadki and colleagues revealed no statistically significant association between -336A/G polymorphism and pulmonary TB (Sadki et al., 2009). This finding is in agreement with results reported in Tunisian, north-western Colombian, West African and eastern Chinese populations (Ben-Ali et al., 2007; Gómez et al., 2006; Olesen et al., 2007; Yi, Zhang, Mo, Zhen, & Zhao, 2015; Zheng et al., 2011).

A positive association between a CD209 -336G variant and tuberculosis has been documented in South African (Barreiro et al., 2006), Indian (Selvaraj, Alagarasu, Swaminathan, Harishankar, & Narendran, 2009), Iranian (Naderi et al., 2014), Brazilian populations (da Silva et al., 2014) and in Russian pulmonary TB male patients infected with Beijing strain, where the lethal outcome of disease is more frequent (Ogarkov et al., 2012). Furthermore, contradictory data have been observed in West African (from Gambia, Guinea, Guinea-Bissau, Malawi) populations where a -336G variant has been found to be associated with protection against pulmonary TB (Vannberg et al., 2008).

No other studies that replicate the results published or that provide a clearer view regarding the involvement of the genetic variation of CD209 on the susceptibility or resistance to TB have been reported elsewhere. Recent meta-analysis studies have been conducted in order to examine the correlation between the CD209-336A/G variant and the risk of contracting TB (Chang et al., 2012; Miao, Li, Sun, Li, & Xu, 2012; Yi et al., 2015). These studies suggested that CD209 -336A/G and -871A/G polymorphisms may play a role in contributing to TB susceptibility. Considering its crucial role in allowing the entry of Mtb into phagocytic cells, it could be suggested that any genetic variation affecting its interaction with ManLAM could therefore modulate the response to TB infection (Figure 2). More studies at a genetic level are needed to collect more data to clarify the implication of a genetic variation of CD209 on the outcome of TB infection.

As Mtb can infect phagocytic cells via other pathways using other and nonspecific receptors, the physiopathological processes could be affected to some degree. Thus, the immunogenetic history of TB infection suggests the participation of other genes, and DC-SIGN may act as a facilitating factor for the dissemination of Mtb. Therefore, the outcome of the TB infection is determined by the orchestration of all these genes.



Among the major innate immune factors, Toll-like receptors (TLRs) represent a cluster of highly conserved molecules that are included in a large family of pattern-recognition receptors (PRRs) (Aderem & Ulevitch, 2000; Kawai & Akira, 2006). TLRs are expressed in several immune cells, including monocytes/macrophages, dendritic cells and B cells (Akira, Uematsu, & Takeuchi, 2006). Ten subgroups of TLRs have been described and recognize microbial components, known as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), with some specificity among them (Takeda & Akira, 2001). This engagement activates signalling cascades, leading to induce expression of genes involved

Biochemical studies of TLRs have shown that these molecules consist of two domains: an extracytoplasmic domain with a leucine-rich repeat for binding to PAMPs and a cytoplasmic domain similar to the same region of the interleukin IL-1 receptor, identified as the Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain for signalling pathways (Aderem & Ulevitch, 2000). Any genetic variation that occurs in these two

domains could theoretically affect the capacity of TLR molecules to recognize the PAMPs and translate their signals (Arbour et al., 2000; Lin, Verma, & Hodgkinson, 2012).

Numerous diseases have been associated with TLR polymorphisms, including infectious diseases (Kang et al., 2012; Medhi et al., 2011), cancer (Theodoropoulos et al., 2012) and allergies (Hussein, Awad, Shalaby, Ali, & Alzahrani, 2012; Zhang et al., 2011). Obviously, the increased risk of developing TB is influenced by the occurrence of functional SNPs in TLR genes, as has been reported (Ben-Ali, Barbouche, Bousnina, Chabbou, & Dellagi, 2004; Medvedev, 2013; Ogus et al., 2004; Yim et al., 2006). Many studies have reported a significant association between TB and TLR variants. In some cases, as with others genes, this association is not observed in all populations. In a Moroccan case-control study, the authors found a statistically significant association between both TLR2 and TLR4 polymorphisms and TB: an increase in TLR2 + 597 CT genotype frequency in healthy controls is associated with protection against pulmonary TB, while an increase in TLR4 + 7263 C allele in patients suggest its probable involvement in TB development (Arji et al., 2014). These data have not been replicated in other populations (Wu, Hu, Li, Jiang, & Xu, 2015). A haplotype analysis showed a negative association between TLR4 + 4434AA-TLR2 + 597 CT genotype frequency and TB.

Convincing and contradictory data are reported with regard to the contribution of both TLR variants to the outcome of this disease for other populations. Hence, the TLR2 + 597 CC genotype seems to play a significant role in pulmonary TB, and even more so in miliary TB and in TB meningitis in the Vietnamese population (Thuong et al., 2007). No significant associations were found between the TLR2 T597C polymorphism and PTB susceptibility among Chinese (Xue et al., 2010) and Indian populations (Biswas, Gupta, Sindhwani, & Patras, 2009). A recent meta-analysis corroborates this finding and has suggested that TLR2 T597C polymorphism might not be associated with PTB susceptibility among Asian populations (Wang et al., 2013).

Others TLR variants relating to TLR 1,6,7,8,9 and 10 genes were identified as being associated with TB in other populations using case-control studies (Kobayashi et al., 2012; Lai et al., 2016; Ma et al., 2007). Unfortunately, these have not yet been investigated in the Moroccan population. However, a meta-analysis published in this context reports very little involvement of the explored variants in TB development (Schurz et al., 2015). This indicates that the focus should be on genetic screening for other functional SNPs.

2.3 | Natural resistance-associated macrophage protein 1: NRAMP1/SLC11A1

The *SLC11A1* (solute carrier family 11A member 1, alias Lsh/Ity/Bcg) gene is located in the 2q35 chromosomal region (Cellier et al., 1994). It encodes for the NRAMP1 (natural resistance-associated macrophage protein 1) protein, which is an ion transporter mainly expressed in the late endosomes/lysosomes in macrophages. In fact, after TB infection, NRAMP1 is recruited to the phagosomal membrane surrounding the engulfed pathogen and ensures divalent cations (iron and manganese) transport (Gruenheid, Pinner, Desjardins, & Gros, 1997; Searle et al.,

1998). It is involved in iron metabolism and in host control of the proliferation of intracellular pathogens (Barton, Biggs, Baker, Bowen, & Atkinson, 1999). The bactericidal activity of NRAMP1 was also provided by modulating phagosomal pH (Hackam et al., 1998). Several polymorphisms have been reported to be associated with susceptibility to inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis (Shaw et al., 1996) and Crohn's disease (Gazouli et al., 2008), and with a number of infectious diseases such as leprosy (Abel et al., 1998). The NRAMP1 polymorphism was first observed to be associated with TB in 1998 in a West African population (Bellamy et al., 1998). Since then, many studies have investigated this association in different populations. No association has been found between NRAMP1 variants and susceptibility to pulmonary TB in the Moroccan population (El Baghdadi et al., 2003). This finding is in agreement with other results reported in Taiwanese, Thai and Iranian populations (Jafari et al., 2016; Liaw et al., 2002; Merza et al., 2009; Vejbaesya, Chierakul, Luangtrakool, & Sermduangprateep, 2007). By contrast, NRAMP1 polymorphisms were found to be statistically more frequent in TB patients from a variety of ethnic populations, suggesting their potential role in the increased risk of contracting TB and the progression of the disease (Bellamy et al., 1998; Ben-Selma, Harizi, Letaief, & Boukadida, 2012; van Crevel et al., 2009; Fernández-Mestre, Takiff, Alcalá, & Zhenia, 2015; Liu et al., 2004; Nugraha & Anggraini, 2011; Ryu et al., 2000; Søborg et al., 2002; Stagas et al., 2011). However, Delgado, Baena, Thim, and Goldfeld (2002) reported a negative association of the 3' UTR polymorphism with TB, thus suggesting the protective role of this marker in the Cambodian population (Delgado et al., 2002). The meta-analysis conducted by Li et al. (2011) confirmed the potential impact of 3' UTR, D543N, INT4 and 5' (GT)_n polymorphisms on the susceptibility to TB, while Li et al. (2011) also observed significant and limited differences in the data when taking the stratification of the populations into consideration (Li et al., 2011). Hence, these data support the hypothesis that NRAMP1 might play an important role in the host's defence against the development of TB. The lack of association between NRAMP1 and TB in the Moroccan population may be due to gene-environment interactions and/or to genetic ethnic diversity, as mentioned above. In addition, the NRAMP1 effect was most easily detected in families that had little exposure to *Mtb* (Malik et al., 2005), while the Moroccan families in this study were recruited from an endemic TB region (El Baghdadi et al., 2003).

2.4 | Macrophage migration inhibitory factor (MIF):

Human MIF (macrophage migration inhibitory factor) is the first pleiotropic cytokine produced by activated T cells, macrophages and the pituitary gland (Bernhagen et al., 1993; Calandra, Bernhagen, Mitchell, & Bucala, 1994) in response to microbial stimuli. It is identified as a proinflammatory cytokine that might increase the level of the expression of TLR4, and which participates actively through the detection of endotoxin-bearing bacteria (Roger, David, Glauser, & Calandra, 2001; Roger, Glauser, & Calandra, 2001). In fact, during the delayed-type hypersensitivity response, MIF is involved in the inhibition of macrophage migration (Bloom & Bennett, 1966). Moreover, MIF inhibits

activation-induced and p53-dependent apoptosis of macrophages (Hudson et al., 1999; Mitchell et al., 2002) and overrides the anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids (Calandra et al., 1995; Roger, Chanson, Knaup-Reymond, & Calandra, 2005).

The *MIF* gene is located on chromosome 22q11.2 and encodes for a short protein. It has been reported that some genetic variants of *MIF* have been associated with several auto-immune and infectious diseases including arthritis, asthma, scleroderma, lupus, pneumonia and severe malaria (Awandare et al., 2009; Leech et al., 2003; Mizue et al., 2005; Sreih et al., 2011; Wu et al., 2006; Yende et al., 2009). Moreover, *MIF* gene has been shown to be involved in the carcinogenesis of several cancers including head and neck cancer (Kindt et al., 2013), hepatocellular carcinoma (Wang et al., 2014), ovarian cancer (Krockenberger et al., 2012), breast cancer (Lue et al., 2007; Richard, Kindt, & Saussez, 2015).

MIF was first described in the context of the investigation of the immune biomarkers of TB in 1966 (Bloom & Bennett, 1966; David, 1966). Several findings at both genetic and functional levels have been accumulated to confirm the important role played by *MIF* as a key mediator of innate immune responses against *Mtb* (Das et al., 2013; Oddo, Calandra, Bucala, & Meylan, 2005). Among the functional immunological abnormalities shown is the increase in serum levels of *MIF* in pulmonary TB patients (Li, Zeng, & Deng, 2012; Yamada et al., 2002) and in patients with tuberculous granulomas (Wang et al., 2012). Furthermore, *MIF* released by infected human macrophages reduces the growth of virulent *Mtb* (Oddo et al., 2005).

At the genetic level, the first observation related to the association between pulmonary TB and the *MIF*-173G/C (rs755622) polymorphism was described in the Colombian population ($p = .02$), suggesting the possible implication of this genetic variant in the risk of contracting TB (Gómez et al., 2007). Similarly, this result has been replicated in the Moroccan TB population in a case-control association study (Sadki et al., 2010). The data reported that the *MIF* -173°C allele was significantly more common in pulmonary TB cases than it was in healthy controls ($p = .02$, OR = 1.53, 95% CI 1.05–2.24). The same results were shown for different degrees of TB risk in Chinese population (Kuai et al., 2016; Li et al., 2012; Liu et al., 2016; Wang, Zhang, Shi, Zhang, & Liu, 2016) and, more recently, in Iranian populations ($p = .028$) (Hashemi et al., 2015), in which the -173°C allele was found to be associated with susceptibility to TB. This mutation occurred in an interesting region of the *MIF* promoter.

The base change G to C at this SNP creates a potential binding site for AP-4 (activating enhancer binding protein 4) (Donn et al., 2002), a transcription factor that activates both viral and cellular genes by binding to the symmetrical DNA sequence, CAGCTG (Hu, Lüscher, Admon, Mermoud, & Tjian, 1990). This situation may have a considerable effect on the promoter activity of *MIF* and therefore on its level of expression. In fact, individuals carrying an *MIF* -173°C allele have increased serum levels of *MIF* (Donn et al., 2002; Radstake et al., 2005). This situation could play an important role in terms of TB development.

Another genetic variant, a -794 (rs5844572) CATT₅₋₈ microsatellite not yet investigated in Moroccan population, was identified to be

associated with TB in Chinese population (Kuai et al., 2016; Li et al., 2012; Tong et al., 2017; Wang et al., 2016).

Hence, it seems well proven that *MIF*, together with other genes, plays a crucial role in the development of TB, at least during the first stages of infection.

2.5 | Monocyte chemoattractant protein-1 MCP-1/CCL2

Tuberculous granulomas formation, of which the central cellular components are T cells and monocytes, constitutes the first defence strategy to control infection and to prevent the spread of *Mtb*. The migration of these cells is orchestrated by chemokines and their receptors. In this context, one member of the C-C chemokine family, namely monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), also referred to as CCL2 (the chemokine (C-C motif) ligand 2), is considered to be a potent chemotactic factor for monocytes (Ben-Selma, Harizi, & Boukadida, 2011; Flores-Villanueva et al., 2005). Human MCP-1, which is composed of 76 amino acids and has a size of 13 kDa, plays an essential role in the innate immune response against microbial infection (Deshmane, Kremlev, Amini, & Sawaya, 2009; Serbina, Jia, Hohl, & Pamer, 2008; Van Coillie, Van Damme, & Opendakker, 1999). The gene encoded MCP-1 is located on chromosome 17 (17q11.2) (Naruse et al., 1996), for which genetic variations were found to be associated with numerous diseases including coronary artery disease (Szalai et al., 2001), HIV-1 pathogenesis (Gonzalez et al., 2002) and TB (Flores-Villanueva et al., 2005). More than nine genetic polymorphisms have been identified in the coding region and MCP-1 promoter, although it would seem that only the MCP-1 -2518 A/G allele has a significant, functional effect at gene expression level (Flores-Villanueva et al., 2005). The MCP-1 -2518 G allele was found to be associated with an increased susceptibility to TB in most of the cases (Feng et al., 2012; Flores-Villanueva et al., 2005; Ganachari et al., 2010; Shi, Yang, Sun, Yin, & Song, 2015; Tian, Li, Li, Wang, & Cheng, 2015). The homozygous MCP-1-2518 G allele has been reported to be less common in Moroccan and Ghanaian TB patients than it is in healthy controls (Arji et al., 2012; Thye et al., 2009). However, no association has been found between the MCP-1-2518A/G SNP and the risk of contracting TB among Brazilian families (Jamieson et al., 2004), Chinese TB patients from Hong Kong (Chu et al., 2007), Indians (Mishra, Poojary, Raj, & Tiwari, 2012), West Africans from Gambia and Guinea-Bissau, Argentinians and nor among Americans (African American and European ancestries) (Velez Edwards et al., 2012).

Finally, meta-analysis studies revealed that the MCP-1-2518G allele increased the risk of developing TB for Asians and Hispanics, but not for Africans (Feng et al., 2012; Tian et al., 2015; Zhang et al., 2012). More recently, these data have been well supported by the Vázquez-Loarte meta-analysis study; however, the authors stressed that this genetic analysis results were influenced significantly by the ethnicity of the study's subjects, as the MCP-1-2518G allele may not be associated with some Asian groups, such as those from India and Persia (Vázquez-Loarte, Trubnykova, & Guio, 2015).

Similarly, it seems that the MCP-1 variant plays a significant role during the first stage of Mtb infection for Moroccan TB patients but not for other African populations, which could suggest the presence of an African genetic specificity, as explained above.

2.6 | Protein Tyrosine Phosphatase Nonreceptor 22: (PTPN22)

The PTPN22 gene is located at the chromosomal region 1p13.3-p13.1 and encodes the protein belonging to the nonreceptor class 4 subfamily of the protein tyrosine phosphatase family. This protein is the intracellular lymphoid tyrosine phosphatase (LYP) (Cohen, Dadi, Shaoul, Sharfe, & Roifman, 1999) and it is only expressed in the immune cells, including dendritic and B cells, and particularly in T cells (Rhee & Veillette, 2012).

Among the principal functions of LYP is the downregulation of the T-cell activation, which is due to its ability to dephosphorylate its substrates such as Lck, Fyn and Zap-70 (Hermiston, Xu, Majeti, & Weiss, 2002; Mustelin, Abraham, Rudd, Alonso, & Merlo, 2002; Veillette, Latour, & Davidson, 2002). The interaction between LYP and the adaptor molecule Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2) regulates T-cell signalling negatively (Hill et al., 2002). In addition, LYP forms a complex with Src tyrosine kinase (Csk) that is considered to be an important suppressor of T-cell activation (Cohen et al., 1999; Veillette et al., 2002). The important role played by LYP in the control of the immune system is the reason for numerous studies that aim to evaluate the impact of its polymorphism on the development of diseases. Hence, several works have reported a significant association between PTPN22 C1858T (R620W) polymorphism and various diseases, such as type 1 diabetes (Bottini et al., 2004), rheumatoid arthritis (Begovich et al., 2004), systemic lupus erythematosus (Kyogoku et al., 2004), Hashimoto's thyroiditis (Criswell et al., 2005) and systemic sclerosis (Diaz-Gallo et al., 2011). Gomez, Anaya, and Martin's (2005) work was the first study to relate PTPN22 1858C/T polymorphism to TB in Colombians (Gomez et al., 2005).

A case-control study was conducted using two cohorts of 123 pulmonary TB patients and 155 healthy controls. And the data reported a significant and opposing association between R620W and R263Q genetic variants of the PTPN22 gene and tuberculosis in the Moroccan population (Lamsyah et al., 2009). The first may play a protective role, while the R263Q variant (PTPN22 G788A) may increase the risk of susceptibility to TB in this population.

This finding concerning the negative association between the PTPN22 1858T (620W) allele and pulmonary TB is in agreement with the results reported concerning Colombian and Brazilian populations (Boechat, Ogusku, Sadahiro, & dos Santos, 2013; Gomez et al., 2005). By contrast, this result contradicts data reported regarding an Iranian ethnic group (Zahedan), in which the minor allele T is not associated with susceptibility to TB (Kouhpayeh et al., 2012).

At this stage of the research, with regard to the interesting results published to date, functional studies are needed to highlight the effect of PTPN22 polymorphisms and a risk to develop TB. If we consider

the functional studies that have investigated auto-immune diseases, the PTPN22 1858T (W620) allele has a gain-of-function mutation (Gregersen, 2005; Vang et al., 2005). It has been shown that the W620 allele enhances the positive selection of autoreactive B cells (Menard et al., 2011). In addition, impaired TCR signalling has been reported in T cells from patients with auto-immune diseases who carry the LYP-W620 variant (Rieck et al., 2007; Wu et al., 2014). It is interesting that recent data have shown that LYP*W620 homozygous donors displayed exaggerated Th1 responses (Vang et al., 2013). Therefore, in this physiopathological situation, the PTPN22 1858T (R620W) could be a protective factor against TB.

This hypothesis was based on the observation of TB in Moroccan patients, and future studies should be focused on identifying selected T/B-lymphocyte functions containing these mutations.

2.7 | Cytochrome P450 7A1 (CYP7A1)

The CYP7A1 gene is located on chromosome 8q11-q12, spans about 10 kb and consists of six exons and five introns (Cohen et al., 1992; Noshiro & Okuda, 1990). It encodes for cholesterol 7- α -hydroxylase (CYP7A1), which is a member of the cytochrome P450 superfamily of enzymes. It is considered to be the rate-limiting enzyme in the catabolism of cholesterol (Schwarz, Lund, & Russell, 1998).

Numerous studies have reported a significant association between a genetic variation in the CYP7A1 gene and several diseases, as well as metabolic disorders of cholesterol and bile acids, such as atherosclerosis (Lambrinoudaki et al., 2008), colorectal cancer (Hagiwara et al., 2005), hypertension (Fu et al., 2011) and hypercholesterolaemia-hyperlipidaemia (Hofman et al., 2004; Pullinger et al., 2002; Wang et al., 1998).

A link between cholesterol and TB has been established in several studies (Deniz et al., 2007; Kim et al., 2010; Pérez-Guzmán, Vargas, Quiñonez, Bazavilvazo, & Aguilar, 2005). TB patients have a low serum level of cholesterol (Pérez-Guzmán & Vargas, 2006). On the other hand, cholesterol plays a potential role in the function of the immune system. It has been reported previously that cholesterol is required for the adequate development of the cytotoxic function of human lymphocytes (Dabrowski, Peel, & Thomson, 1980), as it participates in cytotoxic lymphocyte differentiation and proliferation (Heiniger & Marshall, 1982). Therefore, CYP7A1 could be a good candidate gene in terms of its potential involvement in the development of TB. In this context, a first work has been published on the association between the CYP7A1 variant and TB for the first time (Qraflí et al., 2014). In fact, the study reported a significant association between the rs3808607 variant of the CYP7A1 gene and the susceptibility to TB in the Moroccan population ($p = .02$, OR = 1.93, 95% CI: 1.93 (1.07; 3.49)). This SNP (A/C) is located in the promoter region at the position -204 and the genetic variation that occurs here may affect the genetic expression of CYP7A1. The strong argument that this molecule could have a significant effect on the susceptibility to TB is based on the fact that the CYP7A1 gene is located in chromosome region 8q12-q13. A major susceptibility locus has been identified in this position

using a genome scan study in Moroccan multiplex tuberculosis families (Baghdadi et al., 2006). Another recent work conducted in Chinese population has linked CYP7A1 polymorphisms and TB. The authors reported that TB patients carrying an AG genotype of rs1457043 and G-C or G-A haplotypes of rs1457043-rs8192870 in CYP7A1 were at a higher risk to develop anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity (Chen et al., 2016). Finally, it is recommended that further studies, analysing other genes linked to the CYP7A1 gene, should be designed in conjunction with immunological evaluations that are more complementary.

2.8 | Vitamin D Receptor (VDR)

The VDR gene is located on chromosome 12 at q13.1. It contains 11 exons and spans about 75 kb. This gene encodes for an intracellular hormone receptor that binds the active form of vitamin D and hence produces many biological effects (Baker et al., 1988).

Vitamin D is an indispensable element in bone health (Deluca, 2014). It has long been recognized for its role in bone mineralization and the prevention of rickets. Furthermore, as it is essential for calcium absorption, vitamin D is reported to modulate both innate and adaptive immune responses (Baeke, Takiishi, Korf, Gysemans, & Mathieu, 2010; Kroner, Sommer, & Fabri, 2015). The expression of its receptor in several immune cells such as APC (antigen-presenting cells), B and T cells highlights its importance for a pathological situation. In fact, vitamin D deficiency is associated with an increased risk of developing auto-immune diseases (Adorini, 2005; Ritterhouse et al., 2011), cancers (Yao & Ambrosone, 2013) and infectious diseases (Kroner et al., 2015; Lang, Samaras, Samaras, & Aspinall, 2013). In this regard, there is increasing epidemiologic evidence linking vitamin D deficiency to susceptibility to TB (Gibney et al., 2008; Nnoaham & Clarke, 2008; Sutaria, Liu, & Chen, 2014; Wejse et al., 2007).

Furthermore, the activation of TLRs on the macrophages induces an upregulation of the vitamin D receptor (VDR) and vitamin D1-hydroxylase gene expression, leading to the promotion of the expression of LL-37, a cationic antimicrobial peptide human cathelicidin. It is interesting to note that it has been shown that the exogenous addition of LL-37 or the endogenous overexpression of cathelicidin in macrophages reduces the intracellular survival of mycobacteria (Liu et al., 2006; Sonawane et al., 2011; Sutaria et al., 2014). The active metabolite of vitamin D-1, 25-dihydroxyvitamin D3, can induce the synthesis of nitric oxide that is able to suppress the growth of Mtb (Rockets et al., 1998).

It is also important to mention reports that vitamin D3 and retinoic acid act synergistically to downregulate TACO (tryptophan aspartate-containing coat protein) gene expression. Phagosomal retention of TACO restricts their maturation (Ferrari, Langen, Naito, & Pieters, 1999). As a result of decreased TACO expression, macrophages allow the maturation of mycobacterial phagosome, leading to the degradation of the pathogen (Anand, Kaul, & Sharma, 2008).

At a genetic level, several teams have evaluated the impact of the polymorphisms of the VDR gene on the development of TB. The most important polymorphisms explored by the authors are Fok T/C

(rs10735810), Apa T/G (rs7975232), Taq C/T (rs731236) and Bsm A/G (rs1544410). Published data regarding the distribution of allele, genotype and haplotype frequencies for these four polymorphisms in patients and in healthy controls are inconclusive. In the Moroccan population, none of these variants may have a direct effect on the susceptibility or resistance to TB (Arji et al., 2014). By contrast, the researchers found a significantly higher frequency of the VDR (f, b, a, T) (Fok I f, Bsm I b, Apa I a, Taq I T) haplotype in controls than they did in patients, suggesting a protective effect against PTB ($p < .00001$). Similarly, no association has been reported in South and West African (Babb et al., 2007; Bornman et al., 2004; Lombard, Dalton, Venter, Williams, & Bornman, 2006), Indian (Singh, Gaughan, & Kashyap, 2011; Wilkinson et al., 2000), Tanzanian (Søborg et al., 2007), Cambodian (Delgado et al., 2002), Peruvian (Roth et al., 2004) and Venezuelan populations (Fernández-Mestre et al., 2015).

In contrast, others studies described a significant association between VDR polymorphisms and risk to develop TB in Turkish (BsmI, $p = .0006$) (Ates et al., 2011), Gambian (TaqI, $p = .01$) (Bellamy et al., 1999), Chinese (FokI, $p < .05$) (Chen et al., 2006; Liu et al., 2004), Indian (Joshi et al., 2014) (BsmI, $p < .002$), Iranian (Banoei et al., 2010; Merza et al., 2009; Salimi, Farajian-Mashhadi, Alavi-Naini, Talebian, & Narooie-Nejad, 2015) and Taiwanese (TaqI, $p = .035$; BsmI, $p = .034$) populations (Lee et al., 2016).

Contradictory data were reported by Olesen et al. (2007). The authors described a negative association between A allele from Apa I VDR variant (rs7975232) and risk to develop TB in West Africans from Guinea-Bissau ($p = .012$; Olesen et al., 2007).

Meta-analysis studies are also disagree and, in some cases, are completely at variance in terms of the evaluation of the risk of the association between each VDR variant and TB (Areeshi, Mandal, Akhter, Panda, & Haque, 2014; Lee & Song, 2015; Lewis, Baker, & Davey Smith, 2005). Additional functional studies are recommended to evaluate the contribution of the VDR gene in the immunopathogenesis of TB development.

2.9 | Interleukin 12p40 (IL12p40/IL12Rβ1)

Numerous cytokines are released to generate sufficient protection against TB progression, such as interferon- γ (IFN- γ) (Goldsack & Kirman, 2007), IL-17 (Khader et al., 2007) and IL-12 (Cooper et al., 1995; Verreck et al., 2002), which is considered to be a key immunoregulatory cytokine for T-lymphocyte and NK cell responses. This cytokine is mainly produced by antigen-presenting cells. Interleukin 12, designated also as IL-12p70, consists of two covalently linked subunits: IL-12p35 (35 kDa) and IL-12p40 (40 kDa), each of which is encoded by a different gene. The signalling pathway involving IL-12 is mediated via binding to a receptor complex, expressed in a target cell, which is also composed of two subunits: IL-12R β 1 and IL-12R β 2 (Batten & Ghilardi, 2007; Trinchieri, Pflanz, & Kastelein, 2003). Among the important biological activities of IL-12 are the induction of IFN- γ production (Murphy et al., 1994) and the activation of CD4⁺ T cells to differentiate into Type 1 T-helper (Th1) cells (Hsieh et al., 1993; Manetti et al., 1993), which are important for the clearance of intracellular pathogens such as Mtb.

TABLE 2 Candidate genes associated with a risk or resistance to TB in Moroccan population

Genes/Polymorphism	Association with TB		<i>p</i> -value	OR	References
	Positive	Negative			
TLR2/+597CT		X	.016	0.65 (0.45–0.94)	Arji et al. (2014)
TLR4/+7263C	X		.021	1.63 (1.06–2.57)	
MIF/-173CC	X		.02	1.53 (1.05–2.24)	Sadki et al. (2010)
MCP-1/-2518GG		X	.016	0.35 (0.13–0.86)	Arji et al. (2012)
PTPN22/1885T		X	.01	0.14 (0.01–0.93)	Lamsyah et al. (2009)
CYP7A1-204AA	X		.02	1.93 (1.07–3.49)	Qraflı et al. (2014)
VDR (f-b-a-T) haplotype		X	<.00001	0.18 (0.09–0.35)	Arji et al. (2014)
IL-12Rβ1					Remus et al. (2004)
–111A/T		X	.019	2.03 (1.04–4.04)	
–2C/T			.013	2.69 (1.19–6.09)	
STAT4 rs897200 GG		X	.019	1.35 (1.05–1.74)	Sabri et al. (2014)

It is interesting that the exogenous application of IL-12 in mice results in a significantly increased incidence of survival and in a lower bacterial load (Cooper et al., 1995; Flynn et al., 1995).

As a result of the observation of the strong relationship between a genetic abnormality that affects the IL-12/IFN γ axis and the susceptibility to TB, several authors have become interested in identifying all possible variants, particularly those concerning IL-12p40, IL-12R β 1 and IFN- γ R1 genes (Azad, Sadee, & Schlesinger, 2012; Filipe-Santos et al., 2006; Vannberg, Chapman, & Hill, 2011).

In Moroccan TB patients, three genetic studies were performed concerning the IL-12 cytokine and its receptors, and some of variants explored seemed to be associated with susceptibility to TB (Table 2). The first one reported by Remus et al. used a family statistical model concerning two promoters, polymorphisms IL-12R β 1(–111A/T) and IL-12R β 1(–2C/T), which were in strong linkage disequilibrium (Remus et al., 2004). The second finding comes from a genetic study that was conducted with 50 children who had severe tuberculosis, which originated in Morocco, Iran and Turkey. The authors identified homozygous mutations in IL12R β 1 in two patients (from Morocco and Turkey) and reported that IL-12R β 1 deficiency is not an extremely rare cause of paediatric tuberculosis in these countries; furthermore, rare Mendelian mutations may contribute to the increased incidence in endemic regions (Boisson-Dupuis et al., 2011). By contrast, a third work revealed that the IL-12B (p40) +1188 A/C polymorphism may have no impact on the development of TB (Arji et al., 2012). These results are in agreement with some studies and in contradiction to those conducted in other populations, such as African American, Indian, South African and European populations (Liu et al., 2014; Ma et al., 2003; Möller, Nebel, van Helden, Schreiber, & Hoal, 2010; Morris et al., 2011; Selvaraj et al., 2008). The involvement of the IL12/IFN- γ axis in the susceptibility to TB in the Moroccan population is also supported by a recent finding, which revealed that six SNPs (rs1400654, rs3024861, rs6752770, rs1031509, rs7572482 and rs897200) were found to be more common in TB patients than they were in healthy controls ($p < .05$; Sabri et al., 2014). All these SNPs were grouped into three clusters; based on a statistical analysis model, rs897200 SNP

(GG genotype) is most significantly associated with the development of TB (Table 2).

Based on the accumulated information related to the function of the genes cited above, we propose a scenario concerning the functional implications for the Moroccan population (Figure 2).

In the light of all the immunogenetic investigations into the Moroccan population, it seems that most of these genes are clustered in the innate immunity pathway, which could suggest that the failure of resistance to Mtb dissemination is more in the early stages of infection. It is true that the contribution of adaptive immunity response, through its specific mediators of immunity such as T-lymphocyte subpopulations, particularly Th1 and Treg, plays a crucial role in controlling Mtb infection. In addition, it is well known that the differential polarization of T lymphocytes is mediated by dendritic cells and may also be effective depending on their genetic backgrounds (Banchereau & Steinman, 1998; Walsh & Mills, 2013). It would appear that the global odds ratio of each variant determines resistance or susceptibility to TB. During the first stages of infection, all the candidate genes mentioned above could act together or some could act together to determine the outcome of the disease. For instance, in the Moroccan population, DC-SIGN could increase the uptake of Mtb by phagocytic cells, but the history of the pathological process may require the contribution of others genes that increase the risk of TB susceptibility and, following the time of their participation in both innate and adaptive immunity, may include genes such as *NRAMP1*, *MIF*, *VDR*, *STAT4*, *PTPN22*, *CYP7A1* genes and others not yet identified (Figure 2). With regard to the *NRAMP1* gene, no association was found between the variants tested in our population and TB, which seems to be in contrast to the main finding in this context. Thus, we suggest that this gene is likely to play a role if certain, as yet unidentified environmental factors are present to enhance the progression of active TB.

3 | CONCLUSION

Genetic predisposition of the Moroccan population to TB involves a variety of genetic host factors. Each contributes to the increased

risk of contracting the disease in a specific manner. Further investigations into the genotype and gene–gene interaction mechanisms are mandatory to evaluate the level and frequency of susceptibility to TB. Moreover, it will be necessary to consider the potential interactions between genes and the environment because the intensity of the exposure to TB, gender, poor economic conditions, malnutrition, stress and co-infection diseases are known to contribute to increase the risk of contracting TB. The conflicting results reported in the literature highlighted the strong influence of ethnicity and suggest the influence of a previous history of TB exposure on the host's genetic background. In most of the documented studies, the variations in the design (sample size, inclusion criteria, environment factors and so on) and the methodology used could affect the statistical analyses significantly. Finally, careful consideration should be given to the likely effect of interplay between the host's genetic background and Mtb strains in the determination of TB outcomes.

ETHICS

None applicable.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have declared that there are no conflicting interests.

ORCID

K. Sadki  <http://orcid.org/0000-0002-9224-5050>

REFERENCES

- Abel, L., Sánchez, F. O., Oberti, J., Thuc, N. V., Hoa, L. V., Lap, V. D., ... Schurr, E. (1998). Susceptibility to Leprosy Is Linked to the Human NLRP1 Gene. *Journal of Infectious Diseases*, 177(1), 133–145. <https://doi.org/10.1086/513830>
- Aderem, A., & Ulevitch, R. J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 406(6797), 782–787. <https://doi.org/10.1038/35021228>
- Adorini, L. (2005). Intervention in autoimmunity: The potential of vitamin D receptor agonists. *Cellular Immunology*, 233(2), 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2005.04.013>
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Amirzargar, A. A., Rezaei, N., Jabbari, H., Danesh, A.-A., Khosravi, F., Hajabdolbaghi, M., ... Nikbin, B. (2006). Cytokine single nucleotide polymorphisms in Iranian patients with pulmonary tuberculosis. *European Cytokine Network*, 17(2), 84–89.
- Anand, P. K., Kaul, D., & Sharma, M. (2008). Synergistic action of vitamin D and retinoic acid restricts invasion of macrophages by pathogenic mycobacteria. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection*, 41(1), 17–25.
- Arbour, N. C., Lorenz, E., Schutte, B. C., Zabner, J., Kline, J. N., Jones, M., ... Schwartz, D. A. (2000). TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nature Genetics*, 25(2), 187–191. <https://doi.org/10.1038/76048>
- Areeshi, M. Y., Mandal, R. K., Akhter, N., Panda, A. K., & Haque, S. (2014). Evaluating the association between taqi variant of vitamin D receptor gene and susceptibility to tuberculosis: A meta-analysis. *Toxicology International*, 21(2), 140–147. <https://doi.org/10.4103/0971-6580.139791>
- Arji, N., Busson, M., Iraqi, G., Bourkadi, J. E., Benjouad, A., Bouayad, A., ... Tamouza, R. (2014). Genetic diversity of TLR2, TLR4, and VDR loci and pulmonary tuberculosis in Moroccan patients. *Journal of Infection in Developing Countries*, 8(4), 430–440.
- Arji, N., Busson, M., Iraqi, G., Bourkadi, J. E., Benjouad, A., Boukouaci, W., ... Tamouza, R. (2012). The MCP-1 (CCL2) -2518 GG genotype is associated with protection against pulmonary tuberculosis in Moroccan patients. *Journal of Infection in Developing Countries*, 6(1), 73–78.
- Ates, O., Dolek, B., Dalyan, L., Musellim, B., Ongen, G., & Topal-Sarikaya, A. (2011). The association between BsmI variant of vitamin D receptor gene and susceptibility to tuberculosis. *Molecular Biology Reports*, 38(4), 2633–2636. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0404-8>
- Awandare, G. A., Martinson, J. J., Were, T., Ouma, C., Davenport, G. C., Ong'echa, J. M., Perkins, D. J. (2009). MIF (macrophage migration inhibitory factor) promoter polymorphisms and susceptibility to severe malarial anemia. *The Journal of Infectious Diseases*, 200(4), 629–637. <https://doi.org/10.1086/600894>
- Azad, A. K., Sadee, W., & Schlesinger, L. S. (2012). Innate immune gene polymorphisms in tuberculosis. *Infection and Immunity*, 80(10), 3343–3359. <https://doi.org/10.1128/IAI.00443-12>
- Babb, C., van der Merwe, L., Beyers, N., Pfeiffer, C., Walz, G., Duncan, K., ... Hoal, E. G. (2007). Vitamin D receptor gene polymorphisms and sputum conversion time in pulmonary tuberculosis patients. *Tuberculosis (Edinb)*, 87(4), 295–302. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2007.03.001>
- Baeke, F., Takiishi, T., Korf, H., Gysemans, C., & Mathieu, C. (2010). Vitamin D: Modulator of the immune system. *Current Opinion in Pharmacology*, 10(4), 482–496. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2010.04.001>
- Baghdadi, J. E., Orlova, M., Alter, A., Ranque, B., Chentoufi, M., Lazrak, F., ... Abel, L. (2006). An autosomal dominant major gene confers predisposition to pulmonary tuberculosis in adults. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(7), 1679–1684. <https://doi.org/10.1084/jem.20060269>
- Baker, A. R., McDonnell, D. P., Hughes, M., Crisp, T. M., Mangelsdorf, D. J., Haussler, M. R., ... O'Malley, B. W. (1988). Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(10), 3294–3298.
- Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673), 245–252. <https://doi.org/10.1038/32588>
- Banoei, M. M., Mirsaedi, M. S., Houshmand, M., Tabarsi, P., Ebrahimi, G., Zargari, L., ... Ramirez, J. (2010). Vitamin D receptor homozygote mutant tt and bb are associated with susceptibility to pulmonary tuberculosis in the Iranian population. *International Journal of Infectious Diseases: IJID*, 14(1), e84–e85. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2009.05.001>
- Barreiro, L. B., Neyrolles, O., Babb, C. L., Tailleur, L., Quach, H., McElreavey, K., ... Quintana-Murci, L. (2006). Promoter variation in the DC-SIGN-encoding gene CD209 is associated with tuberculosis. *PLoS Medicine*, 3(2), e20. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030020>
- Barton, C. H., Biggs, T. E., Baker, S. T., Bowen, H., & Atkinson, P. G. (1999). Nramp1: A link between intracellular iron transport and innate resistance to intracellular pathogens. *Journal of Leukocyte Biology*, 66(5), 757–762.
- Batten, M., & Ghilardi, N. (2007). The biology and therapeutic potential of interleukin 27. *Journal of Molecular Medicine*, 85(7), 661–672. <https://doi.org/10.1007/s00109-007-0164-7>

- Begovich, A. B., Carlton, V. E. H., Honigberg, L. A., Schrod, S. J., Chokkalingam, A. P., Alexander, H. C., ... Gregersen, P. K. (2004). A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *American Journal of Human Genetics*, 75(2), 330–337. <https://doi.org/10.1086/422827>
- Bellamy, R., Beyers, N., McAdam, K. P., Ruwende, C., Gie, R., Samaai, P., ... Hill, A. V. (2000). Genetic susceptibility to tuberculosis in Africans: A genome-wide scan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(14), 8005–8009. <https://doi.org/10.1073/pnas.140201897>
- Bellamy, R., Ruwende, C., Corrah, T., McAdam, K. P., Thursz, M., Whittle, H. C., & Hill, A. V. (1999). Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variation in the vitamin D receptor gene. *The Journal of Infectious Diseases*, 179(3), 721–724. <https://doi.org/10.1086/314614>
- Bellamy, R., Ruwende, C., Corrah, T., McAdam, K. P., Whittle, H. C., & Hill, A. V. (1998). Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. *The New England Journal of Medicine*, 338(10), 640–644. <https://doi.org/10.1056/NEJM199803053381002>
- Ben-Ali, M., Barbouche, M.-R., Bousnina, S., Chabbou, A., & Dellagi, K. (2004). Toll-like receptor 2 Arg677Trp polymorphism is associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11(3), 625–626. <https://doi.org/10.1128/CDLI.11.3.625-626.2004>
- Ben-Ali, M., Barreiro, L. B., Chabbou, A., Haltiti, R., Braham, E., Neyrolles, O., ... Barbouche, M.-R. (2007). Promoter and neck region length variation of DC-SIGN is not associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients. *Human Immunology*, 68(11), 908–912. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2007.09.003>
- Ben-Selma, W., Harizi, H., & Boukadida, J. (2011). MCP-1 -2518 A/G functional polymorphism is associated with increased susceptibility to active pulmonary tuberculosis in Tunisian patients. *Molecular Biology Reports*, 38(8), 5413–5419. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-0695-4>
- Ben-Selma, W., Harizi, H., Letaief, M., & Boukadida, J. (2012). Age- and gender-specific effects on NRAMP1 gene polymorphisms and risk of the development of active tuberculosis in Tunisian populations. *International Journal of Infectious Diseases: IJID*, 16(7), e543–e550. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2011.11.016>
- Bernhagen, J., Calandra, T., Mitchell, R. A., Martin, S. B., Tracey, K. J., Voelker, W., ... Bucala, R. (1993). MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature*, 365(6448), 756–759. <https://doi.org/10.1038/365756a0>
- Biswas, D., Gupta, S. K., Sindhvani, G., & Patras, A. (2009). TLR2 polymorphisms, Arg753Gln and Arg677Trp, are not associated with increased burden of tuberculosis in Indian patients. *BMC Research Notes*, 2, 162. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-2-162>
- Bloom, B. R., & Bennett, B. (1966). Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science (New York, N.Y.)*, 153(3731), 80–82.
- Boechat, A. L., Ogusku, M. M., Sadahiro, A., & dos Santos, M. C. (2013). Association between the PTPN22 1858C/T gene polymorphism and tuberculosis resistance. *Infection, Genetics and Evolution*, 16, 310–313. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.02.019>
- Boisson-Dupuis, S., El Baghdadi, J., Parvaneh, N., Bousfiha, A., Bustamante, J., Feinberg, J., ... Casanova, J.-L. (2011). IL-12R β 1 deficiency in two of fifty children with severe tuberculosis from Iran, Morocco, and Turkey. *PLoS ONE*, 6(4), e18524. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018524>
- Bornman, L., Campbell, S. J., Fielding, K., Bah, B., Sillah, J., Gustafson, P., ... Hill, A. V. S. (2004). Vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in West Africa: A case-control and family study. *The Journal of Infectious Diseases*, 190(9), 1631–1641. <https://doi.org/10.1086/424462>
- von Both, U., Kaforou, M., Levin, M., & Newton, S. M. (2015). Understanding immune protection against tuberculosis using RNA expression profiling. *Vaccine*, 33(40), 5289–5293. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.05.025>
- Bottini, N., Musumeci, L., Alonso, A., Rahmouni, S., Nika, K., Rostamkhani, M., ... Mustelin, T. (2004). A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type 1 diabetes. *Nature Genetics*, 36(4), 337–338. <https://doi.org/10.1038/ng1323>
- Calandra, T., Bernhagen, J., Metz, C. N., Spiegel, L. A., Bacher, M., Donnelly, T., ... Bucala, R. (1995). MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature*, 377(6544), 68–71. <https://doi.org/10.1038/377068a0>
- Calandra, T., Bernhagen, J., Mitchell, R. A., & Bucala, R. (1994). The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *The Journal of Experimental Medicine*, 179(6), 1895–1902.
- Cellier, M., Govoni, G., Vidal, S., Kwan, T., Groulx, N., Liu, J., ... Gros, P. (1994). Human natural resistance-associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression. *The Journal of Experimental Medicine*, 180(5), 1741–1752.
- Chang, K., Deng, S., Lu, W., Wang, F., Jia, S., Li, F., ... Chen, M. (2012). Association between CD209 -336A/G and -871A/G polymorphisms and susceptibility of tuberculosis: A meta-analysis. *PLoS ONE*, 7(7), e41519. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041519>
- Chen, X.-R., Feng, Y.-L., Ma, Y., Zhang, Z.-D., Li, C.-Y., Wen, F.-Q., ... Su, Z.-G. (2006). Study on the association of two polymorphisms of the vitamin D receptor (VDR) gene with the susceptibility to pulmonary tuberculosis (PTB) in Chinese Tibetans. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, Medical Science Edition, 37(6), 847–851.
- Chen, R., Wang, J., Tang, S.-W., Zhang, Y., Lv, X.-Z., Wu, S.-S., ... Zhan, S.-Y. (2016). CYP7A1, BAAT and UGT1A1 polymorphisms and susceptibility to anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 20(6), 812–818. <https://doi.org/10.5588/ijtld.15.0450>
- Cherni, L., Pakstis, A. J., Boussetta, S., Elkamel, S., Frigi, S., Khodjet-EI-Khil, H., ... Kidd, K. K. (2016). Genetic variation in Tunisia in the context of human diversity worldwide. *American Journal of Physical Anthropology*, 161(1), 62–71. <https://doi.org/10.1002/ajpa.23008>
- Chu, S.-F., Tam, C. M., Wong, H. S., Kam, K. M., Lau, Y. L., & Chiang, A. K. S. (2007). Association between RANTES functional polymorphisms and tuberculosis in Hong Kong Chinese. *Genes and Immunity*, 8(6), 475–479. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364412>
- Cobat, A., Orlova, M., Barrera, L. F., & Schurr, E. (2013). Host genomics and control of tuberculosis infection. *Public Health Genomics*, 16(1–2), 44–49. <https://doi.org/10.1159/000341499>
- Cohen, J. C., Cali, J. J., Jelinek, D. F., Mehrabian, M., Sparkes, R. S., Lusi, A. J., ... Hobbs, H. H. (1992). Cloning of the human cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7) and localization to chromosome 8q11-q12. *Genomics*, 14(1), 153–161.
- Cohen, S., Dadi, H., Shaoul, E., Sharfe, N., & Roifman, C. M. (1999). Cloning and characterization of a lymphoid-specific, inducible human protein tyrosine phosphatase, Lyp. *Blood*, 93(6), 2013–2024.
- Cooper, A. M., Roberts, A. D., Rhoades, E. R., Callahan, J. E., Getzy, D. M., & Orme, I. M. (1995). The role of interleukin-12 in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology*, 84(3), 423–432.
- Coudray, C., Torroni, A., Achilli, A., Pala, M., Olivieri, A., Larrouy, G., & Dugoujon, J.-M. (2009). Les lignées mitochondriales et l'histoire génétique des populations berbérophones du nord de l'Afrique, pp. 63–72.
- Covert, M. W., Leung, T. H., Gaston, J. E., & Baltimore, D. (2005). Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF- κ B activation. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5742), 1854–1857. <https://doi.org/10.1126/science.1112304>
- van Crevel, R., Parwati, I., Sahiratmadja, E., Marzuki, S., Ottenhoff, T. H. M., Netea, M. G., ... van de Vosse, E. (2009). Infection with *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains is associated with polymorphisms

- in SLC11A1/NRAMP1 in Indonesian patients with tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 200(11), 1671–1674. <https://doi.org/10.1086/648477>
- Criswell, L. A., Pfeiffer, K. A., Lum, R. F., Gonzales, B., Novitzke, J., Kern, M., ... Gregersen, P. K. (2005). Analysis of families in the multiple autoimmune disease genetics consortium (MADGC) collection: The PTPN22 620W allele associates with multiple autoimmune phenotypes. *American Journal of Human Genetics*, 76(4), 561–571. <https://doi.org/10.1086/429096>
- Dabrowski, M. P., Peel, W. E., & Thomson, A. E. (1980). Plasma membrane cholesterol regulates human lymphocyte cytotoxic function. *European Journal of Immunology*, 10(11), 821–827. <https://doi.org/10.1002/eji.1830101105>
- Das, R., Koo, M.-S., Kim, B. H., Jacob, S. T., Subbian, S., Yao, J., ... Bucala, R. (2013). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a critical mediator of the innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(32), E2997–E3006. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301128110>
- David, J. R. (1966). Delayed hypersensitivity in vitro: Its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 56(1), 72–77.
- Delgado, J. C., Baena, A., Thim, S., & Goldfeld, A. E. (2002). Ethnic-specific genetic associations with pulmonary tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 186(10), 1463–1468. <https://doi.org/10.1086/344891>
- Deluca, H. F. (2014). History of the discovery of vitamin D and its active metabolites. *BoneKey Reports*, 3, 479. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2013.213>
- Deniz, O., Gumus, S., Yaman, H., Ciftci, F., Ors, F., Kadir, E., ... Ekiz, K. (2007). Serum total cholesterol, HDL-C and LDL-C concentrations significantly correlate with the radiological extent of disease and the degree of smear positivity in patients with pulmonary tuberculosis. *Clinical Biochemistry*, 40(3–4), 162–166. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2006.10.015>
- Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S., & Sawaya, B. E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 29(6), 313–326. <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>
- Diaz-Gallo, L. M., Gourh, P., Broen, J., Simeon, C., Fonollosa, V., Ortego-Centeno, N., ... Rueda, B. (2011). Analysis of the influence of PTPN22 gene polymorphisms in systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 70(3), 454–462. <https://doi.org/10.1136/ard.2010.130138>
- Donn, R., Alourfi, Z., De Benedetti, F., Meazza, C., Zeggini, E., Lunt, M., ... Ray, D. (2002). Mutation screening of the macrophage migration inhibitory factor gene: Positive association of a functional polymorphism of macrophage migration inhibitory factor with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 46(9), 2402–2409. <https://doi.org/10.1002/art.10492>
- El Baghdadi, J., Remus, N., Benslimane, A., El Annaz, H., Chentoufi, M., Abel, L., & Schurr, E. (2003). Variants of the human NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in Morocco. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 7(6), 599–602.
- Feng, W.-X., Flores-Villanueva, P. O., Mokrousov, I., Wu, X.-R., Xiao, J., Jiao, W.-W., ... Shen, A. (2012). CCL2-2518 (A/G) polymorphisms and tuberculosis susceptibility: A meta-analysis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 16(2), 150–156. <https://doi.org/10.5588/ijtld.11.0205>
- Fernández-Mestre, M., Takiff, H., Alcalá, F., & Zhenia, X. (2015). NRAMP1 and VDR gene polymorphisms in susceptibility to tuberculosis in Venezuelan population. *Disease Markers*, 2015, e860628. <https://doi.org/10.1155/2015/860628>
- Ferrari, G., Langen, H., Naito, M., & Pieters, J. (1999). A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell*, 97(4), 435–447.
- Filipe-Santos, O., Bustamante, J., Chappier, A., Vogt, G., de Beaucoudrey, L., Feinberg, J., ... Casanova, J.-L. (2006). Inborn errors of IL-12/23- and IFN-gamma-mediated immunity: Molecular, cellular, and clinical features. *Seminars in Immunology*, 18(6), 347–361. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2006.07.010>
- Flores-Villanueva, P. O., Ruiz-Morales, J. A., Song, C.-H., Flores, L. M., Jo, E.-K., Montañó, M., ... Granados, J. (2005). A functional promoter polymorphism in monocyte chemoattractant protein-1 is associated with increased susceptibility to pulmonary tuberculosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 202(12), 1649–1658. <https://doi.org/10.1084/jem.20050126>
- Flynn, J. L., Goldstein, M. M., Triebold, K. J., Sypek, J., Wolf, S., & Bloom, B. R. (1995). IL-12 increases resistance of BALB/c mice to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Journal of Immunology*, 155(5), 2515–2524.
- Fu, L., Zhao, Y., Wu, X., Liu, H., Shi, J., Lu, J., & Zhou, B. (2011). CYP7A1 genotypes and haplotypes associated with hypertension in an obese Han Chinese population. *Hypertension Research*, 34(6), 722–727. <https://doi.org/10.1038/hr.2011.18>
- Ganachari, M., Ruiz-Morales, J. A., de la Torre, G., Pretell, J. C., Dinh, J., Granados, J., & Flores-Villanueva, P. O. (2010). Joint effect of MCP-1 genotype GG and MMP-1 genotype 2G/2G increases the likelihood of developing pulmonary tuberculosis in BCG-vaccinated individuals. *PLoS ONE*, 5(1), e8881. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008881>
- Gazouli, M., Atsaves, V., Mantzaris, G., Economou, M., Nasioulas, G., Evangelou, K., ... Anagnou, N. P. (2008). Role of functional polymorphisms of NRAMP1 gene for the development of Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 14(10), 1323–1330. <https://doi.org/10.1002/ibd.20488>
- Geijtenbeek, T. B., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Adema, G. J., van Kooyk, Y., & Figdor, C. G. (2000). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell*, 100(5), 575–585.
- Geijtenbeek, T. B. H., Van Vliet, S. J., Koppel, E. A., Sanchez-Hernandez, M., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., Appelmek, B., & Van Kooyk, Y. (2003). Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *The Journal of Experimental Medicine*, 197(1), 7–17.
- Gibney, K. B., MacGregor, L., Leder, K., Torresi, J., Marshall, C., Ebeling, P. R., & Biggs, B.-A. (2008). Vitamin D deficiency is associated with tuberculosis and latent tuberculosis infection in immigrants from sub-Saharan Africa. *Clinical Infectious Diseases*, 46(3), 443–446. <https://doi.org/10.1086/525268>
- Goldsack, L., & Kirman, J. R. (2007). Half-truths and selective memory: Interferon gamma, CD4(+) T cells and protective memory against tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*, 87(6), 465–473. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2007.07.001>
- Gomez, L. M., Anaya, J.-M., & Martin, J. (2005). Genetic influence of PTPN22 R620W polymorphism in tuberculosis. *Human Immunology*, 66(12), 1242–1247. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2005.11.008>
- Gómez, Luis. M., Anaya, J.-M., Sierra-Filardi, E., Cadena, J., Corbí, A., & Martín, J. (2006). Analysis of DC-SIGN (CD209) functional variants in patients with tuberculosis. *Human Immunology*, 67(10), 808–811. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2006.07.003>
- Gómez, L. M., Sánchez, E., Ruiz-Narvaez, E. A., López-Nevot, M. A., Anaya, J.-M., & Martín, J. (2007). Macrophage migration inhibitory factor gene influences the risk of developing tuberculosis in northwestern Colombian population. *Tissue Antigens*, 70(1), 28–33. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2007.00843.x>
- Gonzalez, E., Rovin, B. H., Sen, L., Cooke, G., Dhanda, R., Mummidi, S., ... Ahuja, S. K. (2002). HIV-1 infection and AIDS dementia are influenced by a mutant MCP-1 allele linked to increased monocyte infiltration of tissues and MCP-1 levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(21), 13795–13800. <https://doi.org/10.1073/pnas.202357499>

- Gregersen, P. K. (2005). Gaining insight into PTPN22 and autoimmunity. *Nature Genetics*, 37(12), 1300–1302. <https://doi.org/10.1038/ng1205-1300>
- Gruenheid, S., Pinner, E., Desjardins, M., & Gros, P. (1997). Natural resistance to infection with intracellular pathogens: The Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. *The Journal of Experimental Medicine*, 185(4), 717–730.
- Hackam, D. J., Rotstein, O. D., Zhang, W., Gruenheid, S., Gros, P., & Grinstein, S. (1998). Host resistance to intracellular infection: Mutation of natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) impairs phagosomal acidification. *The Journal of Experimental Medicine*, 188(2), 351–364.
- Hagiwara, T., Kono, S., Yin, G., Toyomura, K., Nagano, J., Mizoue, T., ... Imaizumi, N. (2005). Genetic polymorphism in cytochrome P450 7A1 and risk of colorectal cancer: The Fukuoka Colorectal Cancer Study. *Cancer Research*, 65(7), 2979–2982. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3872>
- Hashemi, M., Sharifi-Mood, B., Rasouli, A., Amininia, S., Naderi, M., & Taheri, M. (2015). Macrophage migration inhibitory factor -173 G/C polymorphism is associated with an increased risk of pulmonary tuberculosis in Zahedan, Southeast Iran. *EXCLI Journal*, 14, 117–122. <https://doi.org/10.17179/excli2014-636>
- Heiniger, H. J., & Marshall, J. D. (1982). Cholesterol synthesis in polyclonally activated cytotoxic lymphocytes and its requirement for differentiation and proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(12), 3823–3827.
- Henn, B. M., Botigué, L. R., Gravel, S., Wang, W., Brisbin, A., Byrnes, J. K., ... Comas, D. (2012). Genomic ancestry of North Africans supports back-to-Africa migrations. *PLoS Genetics*, 8(1), e1002397. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002397>
- Hermiston, M. L., Xu, Z., Majeti, R., & Weiss, A. (2002). Reciprocal regulation of lymphocyte activation by tyrosine kinases and phosphatases. *The Journal of Clinical Investigation*, 109(1), 9–14. <https://doi.org/10.1172/JCI14794>
- Hill, R. J., Zozulya, S., Lu, Y.-L., Ward, K., Gishizky, M., & Jallal, B. (2002). The lymphoid protein tyrosine phosphatase Lyp interacts with the adaptor molecule Grb2 and functions as a negative regulator of T-cell activation. *Experimental Hematology*, 30(3), 237–244.
- Hofman, M. K., Groenendijk, M., Verkuijlen, P. J. J. H., Jonkers, I. J. A. M., Mohrschladt, M. F., Smelt, A. H. M., & Princen, H. M. G. (2004). Modulating effect of the A-278C promoter polymorphism in the cholesterol 7 α -hydroxylase gene on serum lipid levels in normolipidaemic and hypertriglyceridaemic individuals. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 12(11), 935–941. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201236>
- Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O'Garra, A., & Murphy, K. M. (1993). Development of TH1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5107), 547–549.
- Hu, Y. F., Lüscher, B., Admon, A., Mermod, N., & Tjian, R. (1990). Transcription factor AP-4 contains multiple dimerization domains that regulate dimer specificity. *Genes & Development*, 4(10), 1741–1752.
- Hudson, J. D., Shoaibi, M. A., Maestro, R., Carnero, A., Hannon, G. J., & Beach, D. H. (1999). A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *The Journal of Experimental Medicine*, 190(10), 1375–1382.
- Hussein, Y. M., Awad, H. A., Shalaby, S. M., Ali, A.-S. A., & Alzahrani, S. S. (2012). Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 polymorphisms and susceptibility to asthma and allergic rhinitis: A case-control analysis. *Cellular Immunology*, 274(1–2), 34–38. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.02.006>
- Jafari, M., Nasiri, M. R., Sanaei, R., Anoosheh, S., Farnia, P., Sepanjnia, A., & Tajik, N. (2016). The NRAMP1, VDR, TNF- α , ICAM1, TLR2 and TLR4 gene polymorphisms in Iranian patients with pulmonary tuberculosis: A case-control study. *Infection, Genetics and Evolution*, 39, 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.01.013>
- Jamieson, S. E., Miller, E. N., Black, G. F., Peacock, C. S., Cordell, H. J., Howson, J. M. M., ... Blackwell, J. M. (2004). Evidence for a cluster of genes on chromosome 17q11–q21 controlling susceptibility to tuberculosis and leprosy in Brazilians. *Genes and Immunity*, 5(1), 46–57. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364029>
- Jepson, A., Fowler, A., Banya, W., Singh, M., Bennett, S., Whittle, H., & Hill, A. V. (2001). Genetic regulation of acquired immune responses to antigens of *Mycobacterium tuberculosis*: A study of twins in West Africa. *Infection and Immunity*, 69(6), 3989–3994. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.6.3989-3994.2001>
- Jo, E.-K. (2008). Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs, C-type lectins, and NLRs. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 21(3), 279–286. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3282f88b5d>
- Joosten, S. A., Goeman, J. J., Sutherland, J. S., Opmeer, L., de Boer, K. G., Jacobsen, M., ... Haks, M. C. (2012). Identification of biomarkers for tuberculosis disease using a novel dual-color RT-MLPA assay. *Genes and Immunity*, 13(1), 71–82. <https://doi.org/10.1038/gene.2011.64>
- Joshi, L., Ponnana, M., Penmetsa, S. R., Nallari, P., Valluri, V., & Gaddam, S. (2014). Serum vitamin D levels and VDR polymorphisms (BsmI and FokI) in patients and their household contacts susceptible to tuberculosis. *Scandinavian Journal of Immunology*, 79(2), 113–119. <https://doi.org/10.1111/sji.12127>
- Kallmann, F. J., & Reisner, D. (1943). Twin studies on genetic variations in resistance to tuberculosis. *Journal of Heredity*, 34(9), 269–276.
- Kang, S. H., Abdel-Massih, R. C., Brown, R. A., Dierkhising, R. A., Kremers, W. K., & Razonable, R. R. (2012). Homozygosity for the toll-like receptor 2 R753Q single-nucleotide polymorphism is a risk factor for cytomegalovirus disease after liver transplantation. *The Journal of Infectious Diseases*, 205(4), 639–646. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir819>
- Kawai, T., & Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell Death and Differentiation*, 13(5), 816–825. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401850>
- Kawai, T., Takeuchi, O., Fujita, T., Inoue, J., Mühlradt, P. F., Sato, S., ... Akira, S. (2001). Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *Journal of Immunology*, 167(10), 5887–5894.
- Kettaneh, A., Seng, L., Tiev, K. P., Tolédano, C., Fabre, B., & Cabane, J. (2006). Human leukocyte antigens and susceptibility to tuberculosis: A meta-analysis of case-control studies. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 10(7), 717–725.
- Khader, S. A., Bell, G. K., Pearl, J. E., Fountain, J. J., Rangel-Moreno, J., Cilley, G. E., ... Cooper, A. M. (2007). IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4⁺ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nature Immunology*, 8(4), 369–377. <https://doi.org/10.1038/ni1449>
- Kim, M.-J., Wainwright, H. C., Lockett, M., Bekker, L.-G., Walther, G. B., Dittrich, C., ... Russell, D. G. (2010). Cessation of human tuberculosis granulomas correlates with elevated host lipid metabolism. *EMBO Molecular Medicine*, 2(7), 258–274. <https://doi.org/10.1002/emmm.201000079>
- Kindt, N., Preillon, J., Kaltner, H., Gabius, H.-J., Chevalier, D., Rodriguez, A., ... Saussez, S. (2013). Macrophage migration inhibitory factor in head and neck squamous cell carcinoma: Clinical and experimental studies. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 139(5), 727–737. <https://doi.org/10.1007/s00432-013-1375-7>
- Kirenga, B. J., Ssengooba, W., Muwonge, C., Nakiyingi, L., Kyaligonza, S., Kasozi, S., ... Okwera, A. (2015). Tuberculosis risk factors among tuberculosis patients in Kampala, Uganda: Implications for tuberculosis control. *BMC Public Health*, 15, 13. <https://doi.org/10.1186/s12889-015-1376-3>
- Kobayashi, K., Yuliwulandari, R., Yanai, H., Naka, I., Lien, L. T., Hang, N. T. L., ... Tokunaga, K. (2012). Association of TLR polymorphisms with

- development of tuberculosis in Indonesian females. *Tissue Antigens*, 79(3), 190–197. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2011.01821.x>
- van Kooyk, Y., & Geijtenbeek, T. B. H. (2003). DC-SIGN: Escape mechanism for pathogens. *Nature Reviews. Immunology*, 3(9), 697–709. <https://doi.org/10.1038/nri1182>
- Kouhpayeh, H.-R., Hashemi, M., Hashemi, S.-A., Moazeni-Roodi, A., Naderi, M., Sharifi-Mood, B., ... Ghavami, S. (2012). R620W functional polymorphism of protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 is not associated with pulmonary tuberculosis in Zahedan, southeast Iran. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 11(2), 1075–1081. <https://doi.org/10.4238/2012.April.27.6>
- Krockenberger, M., Kranke, P., Häusler, S., Engel, J. B., Horn, E., Nürnberg, K., ... Hönig, A. (2012). Macrophage migration-inhibitory factor levels in serum of patients with ovarian cancer correlates with poor prognosis. *Anticancer Research*, 32(12), 5233–5238.
- Kroner, J. C., Sommer, A., & Fabri, M. (2015). Vitamin D every day to keep the infection away? *Nutrients*, 7(6), 4170–4188. <https://doi.org/10.3390/nu7064170>
- Kuai, S.-G., Ou, Q.-F., You, D.-H., Shang, Z.-B., Wang, J., Liu, J., ... Huang, L.-H. (2016). Functional polymorphisms in the gene encoding macrophage migration inhibitory factor (MIF) are associated with active pulmonary tuberculosis. *Infectious Diseases*, 48(3), 222–228. <https://doi.org/10.3109/23744235.2015.1107188>
- Kyogoku, C., Langefeld, C. D., Ortmann, W. A., Lee, A., Selby, S., Carlton, V. E. H., ... Behrens, T. W. (2004). Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE. *American Journal of Human Genetics*, 75(3), 504–507.
- Lai, Y.-F., Lin, T.-M., Wang, C.-H., Su, P.-Y., Wu, J.-T., Lin, M.-C., & Eng, H.-L. (2016). Functional polymorphisms of the TLR7 and TLR8 genes contribute to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis (Edinb)*, 98, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2016.03.008>
- Lambrinoudaki, I. V., Kaparos, G. I., Vlachou, S. A., Stamatelopoulou, K. S., Georgiopoulos, G. A., Sergentanis, T. N., ... Papamichael, C. M. (2008). CYP A-204C polymorphism is associated with subclinical atherosclerosis in postmenopausal women. *Menopause*, 15(6), 1163–1168. <https://doi.org/10.1097/gme.0b013e31817727c3>
- Lamsyah, H., Rueda, B., Baassi, L., Elaoud, R., Bottini, N., Sadki, K., & Martin, J. (2009). Association of PTPN22 gene functional variants with development of pulmonary tuberculosis in Moroccan population. *Tissue Antigens*, 74(3), 228–232. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2009.01304.x>
- Lang, P. O., Samaras, N., Samaras, D., & Aspinall, R. (2013). How important is vitamin D in preventing infections? *Osteoporosis International*, 24(5), 1537–1553. <https://doi.org/10.1007/s00198-012-2204-6>
- Lee, S.-W., Chuang, T.-Y., Huang, H.-H., Liu, C.-W., Kao, Y.-H., & Wu, L. S.-H. (2016). VDR and VDBP genes polymorphisms associated with susceptibility to tuberculosis in a Han Taiwanese population. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 49(5), 783–787. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2015.12.008>
- Lee, Y. H., & Song, G. G. (2015). Vitamin D receptor gene FokI, TaqI, BsmI, and ApaI polymorphisms and susceptibility to pulmonary tuberculosis: A meta-analysis. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 14(3), 9118–9129. <https://doi.org/10.4238/2015.August.7.21>
- Leech, M., Lacey, D., Xue, J. R., Santos, L., Hutchinson, P., Wolvetang, E., ... Morand, E. F. (2003). Regulation of p53 by macrophage migration inhibitory factor in inflammatory arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 48(7), 1881–1889. <https://doi.org/10.1002/art.11165>
- Leifer, C. A., & Medvedev, A. E. (2016). Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling. *Journal of Leukocyte Biology*, 100(5), 927–941. <https://doi.org/10.1189/jlb.2MR0316-117RR>
- Lewis, S. J., Baker, I., & Davey Smith, G. (2005). Meta-analysis of vitamin D receptor polymorphisms and pulmonary tuberculosis risk. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 9(10), 1174–1177.
- Li, X., Yang, Y., Zhou, F., Zhang, Y., Lu, H., Jin, Q., & Gao, L. (2011). SLC11A1 (NRAMP1) polymorphisms and tuberculosis susceptibility: Updated systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 6(1), e15831. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015831>
- Li, Y., Yuan, T., Lu, W., Chen, M., Cheng, X., & Deng, S. (2012). Association of tuberculosis and polymorphisms in the promoter region of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in a Southwestern China Han population. *Cytokine*, 60(1), 64–67. <https://doi.org/10.1016/j.cyt.2012.06.010>
- Li, Y., Zeng, Z., & Deng, S. (2012). Study of the relationship between human MIF level, MIF-794CATT5-8 microsatellite polymorphism, and susceptibility of tuberculosis in Southwest China. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16(4), 383–386. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.06.018>
- Liang, B., Guo, Y., Li, Y., & Kong, H. (2014). Association between IL-10 gene polymorphisms and susceptibility of tuberculosis: Evidence based on a meta-analysis. *PLoS ONE*, 9(2), e88448. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088448>
- Liaw, Y. S., Tsai-Wu, J. J., Wu, C. H., Hung, C. C., Lee, C. N., Yang, P. C., ... Kuo, S. H. (2002). Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility of tuberculosis in Taiwanese. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 6(5), 454–460.
- Lin, Y.-T., Verma, A., & Hodgkinson, C. P. (2012). Toll-like receptors and human disease: Lessons from single nucleotide polymorphisms. *Current Genomics*, 13(8), 633–645. <https://doi.org/10.2174/138920212803759712>
- Liu, W., Cao, W. C., Zhang, C. Y., Tian, L., Wu, X. M., Habbema, J. D. F., ... Yang, H. (2004). VDR and NRAMP1 gene polymorphisms in susceptibility to pulmonary tuberculosis among the Chinese Han population: A case-control study. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 8(4), 428–434.
- Liu, A., Li, J., Bao, F., Zhu, Z., Feng, S., Yang, J., ... Voravuthikunchai, S. P. (2016). Single nucleotide polymorphisms in cytokine MIF gene promoter region are closely associated with human susceptibility to tuberculosis in a southwestern province of China. *Infection, Genetics and Evolution*, 39, 219–224. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.12.003>
- Liu, G., Li, G., Xu, Y., Song, N., Shen, S., Jiang, D., ... Wang, H. (2014). Association between IL12B polymorphisms and tuberculosis risk: A meta-analysis. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 401–407. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.12.008>
- Liu, P. T., Stenger, S., Li, H., Wenzel, L., Tan, B. H., Krutzik, S. R., ... Modlin, R. L. (2006). Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5768), 1770–1773. <https://doi.org/10.1126/science.1123933>
- Lombard, Z., Dalton, D.-L., Venter, P. A., Williams, R. C., & Bornman, L. (2006). Association of HLA-DR, -DQ, and vitamin D receptor alleles and haplotypes with tuberculosis in the Venda of South Africa. *Human Immunology*, 67(8), 643–654. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2006.04.008>
- Lue, H., Thiele, M., Franz, J., Dahl, E., Speckgens, S., Leng, L., ... Bernhagen, J. (2007). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes cell survival by activation of the Akt pathway and role for CSN5/JAB1 in the control of autocrine MIF activity. *Oncogene*, 26(35), 5046–5059. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210318>
- Ma, X., Liu, Y., Gowen, B. B., Graviss, E. A., Clark, A. G., & Musser, J. M. (2007). Full-exon resequencing reveals toll-like receptor variants contribute to human susceptibility to tuberculosis disease. *PLoS ONE*, 2(12), e1318. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001318>
- Ma, X., Reich, R. A., Gonzalez, O., Pan, X., Fothergill, A. K., Starke, J. R., ... Graviss, E. A. (2003). No evidence for association between the polymorphism in the 3' untranslated region of interleukin-12B and human susceptibility to tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 188(8), 1116–1118. <https://doi.org/10.1086/378674>
- Ma, M., Xie, L., Wu, S., Tang, F., Li, H., Zhang, Z., ... Cao, W. (2010). Toll-like receptors, tumor necrosis factor- α , and interleukin-10 gene polymorphisms in risk of pulmonary tuberculosis and disease severity. *Human Immunology*, 71(10), 1005–1010. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2010.07.009>

- Malik, S., Abel, L., Tooker, H., Poon, A., Simkin, L., Girard, M., ... Schurr, E. (2005). Alleles of the NRAMP1 gene are risk factors for pediatric tuberculosis disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(34), 12183–12188. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503368102>
- Manetti, R., Parronchi, P., Giudizi, M. G., Piccinni, M. P., Maggi, E., Trinchieri, G., & Romagnani, S. (1993). Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 177(4), 1199–1204.
- Medhi, S., Deka, M., Deka, P., Swargiary, S. S., Hazam, R. K., Sharma, M. P., ... Kar, P. (2011). Promoter region polymorphism & expression profile of toll like receptor-3 (TLR-3) gene in chronic hepatitis C virus (HCV) patients from India. *The Indian Journal of Medical Research*, 134, 200–207.
- Medvedev, A. E. (2013). Toll-like receptor polymorphisms, inflammatory and infectious diseases, allergies, and cancer. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 33(9), 467–484. <https://doi.org/10.1089/jir.2012.0140>
- Menard, L., Saadoun, D., Isnardi, I., Ng, Y.-S., Meyers, G., Massad, C., ... Meffre, E. (2011). The PTPN22 allele encoding an R620W variant interferes with the removal of developing autoreactive B cells in humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(9), 3635–3644. <https://doi.org/10.1172/JCI45790>
- Merza, M., Farnia, P., Anoosheh, S., Varahram, M., Kazampour, M., Pajand, O., ... Hoffner, S. (2009). The NRAMP1, VDR and TNF-alpha gene polymorphisms in Iranian tuberculosis patients: The study on host susceptibility. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 13(4), 252–256.
- Meyer, C. G., & Thyne, T. (2014). Host genetic studies in adult pulmonary tuberculosis. *Seminars in Immunology*, 26(6), 445–453. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.09.005>
- Miao, R., Li, J., Sun, Z., Li, C., & Xu, F. (2012). Association between the CD209 promoter -336A/G polymorphism and susceptibility to tuberculosis: A meta-analysis. *Respirology*, 17(5), 847–853. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2012.02185.x>
- Mishra, G., Poojary, S. S., Raj, P., & Tiwari, P. K. (2012). Genetic polymorphisms of CCL2, CCL5, CCR2 and CCR5 genes in Sahariya tribe of North Central India: An association study with pulmonary tuberculosis. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(5), 1120–1127. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.03.018>
- Mitchell, R. A., Liao, H., Chesney, J., Fingerle-Rowson, G., Baugh, J., David, J., & Bucala, R. (2002). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: Regulatory role in the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(1), 345–350. <https://doi.org/10.1073/pnas.012511599>
- Mizue, Y., Ghani, S., Leng, L., McDonald, C., Kong, P., Baugh, J., ... Bucala, R. (2005). Role for macrophage migration inhibitory factor in asthma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(40), 14410–14415. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507189102>
- Möller, M., Nebel, A., van Helden, P. D., Schreiber, S., & Hoal, E. G. (2010). Analysis of eight genes modulating interferon gamma and human genetic susceptibility to tuberculosis: A case-control association study. *BMC Infectious Diseases*, 10, 154. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-154>
- Morris, G. A. J., Edwards, D. R. V., Hill, P. C., Wejse, C., Bisseye, C., Olesen, R., ... Sirugo, G. (2011). Interleukin 12B (IL12B) genetic variation and pulmonary tuberculosis: A study of cohorts from The Gambia, Guinea-Bissau, United States and Argentina. *PLoS ONE*, 6(2), e16656. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016656>
- Murphy, E. E., Terres, G., Macatonia, S. E., Hsieh, C. S., Mattson, J., Lanier, L., ... O'Garra, A. (1994). B7 and interleukin 12 cooperate for proliferation and interferon gamma production by mouse T helper clones that are unresponsive to B7 costimulation. *The Journal of Experimental Medicine*, 180(1), 223–231.
- Mustelin, T., Abraham, R. T., Rudd, C. E., Alonso, A., & Merlo, J. J. (2002). Protein tyrosine phosphorylation in T cell signaling. *Frontiers in Bioscience*, 7, d918–d969.
- Naderi, M., Hashemi, M., Taheri, M., Pesarakli, H., Eskandari-Nasab, E., & Bahari, G. (2014). CD209 promoter -336 A/G (rs4804803) polymorphism is associated with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Zahedan, southeast Iran. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection*, 47(3), 171–175. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2013.03.013>
- Narasimhan, P., Wood, J., MacIntyre, C. R., & Mathai, D. (2013). Risk factors for tuberculosis. *Pulmonary Medicine*, 2013, e828939. <https://doi.org/10.1155/2013/828939>
- Naruse, K., Ueno, M., Satoh, T., Nomiya, H., Tei, H., Takeda, M., ... Miura, R. (1996). A YAC contig of the human CC chemokine genes clustered on chromosome 17q11.2. *Genomics*, 34(2), 236–240. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.0274>
- Nnoaham, K. E., & Clarke, A. (2008). Low serum vitamin D levels and tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Epidemiology*, 37(1), 113–119. <https://doi.org/10.1093/ije/dym247>
- Noshiro, M., & Okuda, K. (1990). Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding human cholesterol 7 alpha-hydroxylase. *FEBS Letters*, 268(1), 137–140.
- Nugraha, J., & Anggraini, R. (2011). NRAMP1 polymorphism and susceptibility to lung tuberculosis in Surabaya, Indonesia. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 42(2), 338–341.
- Oddo, M., Calandra, T., Bucala, R., & Meylan, P. R. A. (2005). Macrophage migration inhibitory factor reduces the growth of virulent *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. *Infection and Immunity*, 73(6), 3783–3786. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.6.3783-3786.2005>
- Ogarkov, O., Mokrousov, I., Sinkov, V., Zhdanova, S., Antipina, S., & Savilov, E. (2012). 'Lethal' combination of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and human CD209 -336G allele in Russian male population. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(4), 732–736. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.10.005>
- Ogus, A. C., Yoldas, B., Ozdemir, T., Uguz, A., Olcen, S., Keser, I., ... Yegin, O. (2004). The Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *The European Respiratory Journal*, 23(2), 219–223.
- Olesen, R., Wejse, C., Velez, D. R., Bisseye, C., Sodemann, M., Aaby, P., ... Sirugo, G. (2007). DC-SIGN (CD209), pentraxin 3 and vitamin D receptor gene variants associate with pulmonary tuberculosis risk in West Africans. *Genes and Immunity*, 8(6), 456–467. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364410>
- Oral, H. B., Budak, F., Uzaslan, E. K., Baştürk, B., Bekar, A., Akalin, H., ... Göral, G. (2006). Interleukin-10 (IL-10) gene polymorphism as a potential host susceptibility factor in tuberculosis. *Cytokine*, 35(3–4), 143–147. <https://doi.org/10.1016/j.cyt.2006.07.015>
- Pérez-Guzmán, C., & Vargas, M. H. (2006). Hypcholesterolemia: A major risk factor for developing pulmonary tuberculosis? *Medical Hypotheses*, 66(6), 1227–1230. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2005.12.041>
- Pérez-Guzmán, C., Vargas, M. H., Quiñonez, F., Bazavilvazo, N., & Aguilar, A. (2005). A cholesterol-rich diet accelerates bacteriologic sterilization in pulmonary tuberculosis. *Chest*, 127(2), 643–651. <https://doi.org/10.1378/chest.127.2.643>
- Pullinger, C. R., Eng, C., Salen, G., Shefer, S., Batta, A. K., Erickson, S. K., ... Kane, J. P. (2002). Human cholesterol 7alpha-hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(1), 109–117. <https://doi.org/10.1172/JCI15387>
- Qraflı, M., Amar, Y., Bourkadi, J., Ben-Amor, J., Iraki, G., Bakri, Y., ... Sadki, K. (2014). The CYP7A1 gene rs3808607 variant is associated with susceptibility of tuberculosis in Moroccan population. *The Pan African Medical Journal*, 18, 1. <https://doi.org/10.11604/pamj.2014.18.1.3397>
- Radstake, T. R. D. J., Sweep, F. C. G. J., Welsing, P., Franke, B., Vermeulen, S. H. M., Geurts-Moespot, A., ... van Riel, P. L. C. M. (2005). Correlation of rheumatoid arthritis severity with the genetic functional variants and

- circulating levels of macrophage migration inhibitory factor. *Arthritis and Rheumatism*, 52(10), 3020–3029. <https://doi.org/10.1002/art.21285>
- Ravikumar, M., Dheenadhyalan, V., Rajaram, K., Lakshmi, S. S., Kumaran, P. P., Paramasivan, C. N., ... Pitchappan, R. M. (1999). Associations of HLA-DRB1, DQB1 and DPB1 alleles with pulmonary tuberculosis in south India. *Tubercle and Lung Disease*, 79(5), 309–317.
- Remus, N., El Baghdadi, J., Fieschi, C., Feinberg, J., Quintin, T., Chentoufi, M., ... Abel, L. (2004). Association of IL12RB1 polymorphisms with pulmonary tuberculosis in adults in Morocco. *The Journal of Infectious Diseases*, 190(3), 580–587. <https://doi.org/10.1086/422534>
- Rhee, I., & Veillette, A. (2012). Protein tyrosine phosphatases in lymphocyte activation and autoimmunity. *Nature Immunology*, 13(5), 439–447. <https://doi.org/10.1038/ni.2246>
- Richard, V., Kindt, N., & Saussez, S. (2015). Macrophage migration inhibitory factor involvement in breast cancer (Review). *International Journal of Oncology*, 47(5), 1627–1633. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3185>
- Rieck, M., Arechiga, A., Onengut-Gumuscu, S., Greenbaum, C., Concannon, P., & Buckner, J. H. (2007). Genetic variation in PTPN22 corresponds to altered function of T and B lymphocytes. *Journal of Immunology*, 179(7), 4704–4710.
- Ritterhouse, L. L., Crowe, S. R., Niewold, T. B., Kamen, D. L., Macwana, S. R., Roberts, V. C., ... James, J. A. (2011). Vitamin D deficiency is associated with an increased autoimmune response in healthy individuals and in patients with systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 70(9), 1569–1574. <https://doi.org/10.1136/ard.2010.148494>
- Rockett, K. A., Brookes, R., Udalova, I., Vidal, V., Hill, A. V., & Kwiatkowski, D. (1998). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces nitric oxide synthase and suppresses growth of *Mycobacterium tuberculosis* in a human macrophage-like cell line. *Infection and Immunity*, 66(11), 5314–5321.
- Roger, T., Chanson, A.-L., Knaup-Reymond, M., & Calandra, T. (2005). Macrophage migration inhibitory factor promotes innate immune responses by suppressing glucocorticoid-induced expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1. *European Journal of Immunology*, 35(12), 3405–3413. <https://doi.org/10.1002/eji.200535413>
- Roger, T., David, J., Glauser, M. P., & Calandra, T. (2001). MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature*, 414(6866), 920–924. <https://doi.org/10.1038/414920a>
- Roger, T., Glauser, M. P., & Calandra, T. (2001). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) modulates innate immune responses induced by endotoxin and Gram-negative bacteria. *Journal of Endotoxin Research*, 7(6), 456–460.
- Rossouw, M., Nel, H. J., Cooke, G. S., van Helden, P. D., & Hoal, E. G. (2003). Association between tuberculosis and a polymorphic NFkappaB binding site in the interferon gamma gene. *Lancet*, 361(9372), 1871–1872. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13491-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13491-5)
- Roth, D. E., Soto, G., Arenas, F., Bautista, C. T., Ortiz, J., Rodríguez, R., ... Gilman, R. H. (2004). Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and response to treatment of pulmonary tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 190(5), 920–927. <https://doi.org/10.1086/423212>
- Ryu, S., Park, Y. K., Bai, G. H., Kim, S. J., Park, S. N., & Kang, S. (2000). 3'UTR polymorphisms in the NRAMP1 gene are associated with susceptibility to tuberculosis in Koreans. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 4(6), 577–580.
- Sabri, A., Grant, A. V., Cosker, K., El Azbaoui, S., Abid, A., Abderrahmani Rhorfi, I., ... El Baghdadi, J. (2014). Association study of genes controlling IL-12-dependent IFN- γ immunity: STAT4 alleles increase risk of pulmonary tuberculosis in Morocco. *The Journal of Infectious Diseases*, 210(4), 611–618. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu140>
- Sadki, K., Lamsyah, H., Rueda, B., Akil, E., Sadak, A., Martin, J., & El Aouad, R. (2010). Analysis of MIF, FCGR2A and FCGR3A gene polymorphisms with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Moroccan population. *Journal of Genetics and Genomics*, 37(4), 257–264. [https://doi.org/10.1016/S1673-8527\(09\)60044-8](https://doi.org/10.1016/S1673-8527(09)60044-8)
- Sadki, K., Lamsyah, H., Rueda, B., Lahlou, O., El Aouad, R., & Martin, J. (2009). CD209 promoter single nucleotide polymorphism -336A/G and the risk of susceptibility to tuberculosis disease in the moroccan population. *International Journal of Human Genetics*, 9(3), 239–243.
- Salimi, S., Farajian-Mashhadi, F., Alavi-Naini, R., Talebian, G., & Narooie-Nejad, M. (2015). Association between vitamin D receptor polymorphisms and haplotypes with pulmonary tuberculosis. *Biomedical Reports*, 3(2), 189–194. <https://doi.org/10.3892/br.2014.402>
- Schurz, H., Daya, M., Möller, M., Hoal, E. G., & Salie, M. (2015). TLR1, 2, 4, 6 and 9 variants associated with tuberculosis susceptibility: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 10(10), e0139711. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139711>
- Schwarz, M., Lund, E. G., & Russell, D. W. (1998). Two 7 alpha-hydroxylase enzymes in bile acid biosynthesis. *Current Opinion in Lipidology*, 9(2), 113–118.
- Searle, S., Bright, N. A., Roach, T. I., Atkinson, P. G., Barton, C. H., Meloen, R. H., & Blackwell, J. M. (1998). Localisation of Nramp1 in macrophages: Modulation with activation and infection. *Journal of Cell Science*, 111(Pt 19), 2855–2866.
- Selvaraj, P., Alagarasu, K., Harishankar, M., Vidyarani, M., Nisha Rajeswari, D., & Narayanan, P. R. (2008). Cytokine gene polymorphisms and cytokine levels in pulmonary tuberculosis. *Cytokine*, 43(1), 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.04.011>
- Selvaraj, P., Alagarasu, K., Swaminathan, S., Harishankar, M., & Narendran, G. (2009). CD209 gene polymorphisms in South Indian HIV and HIV-TB patients. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(2), 256–262. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.12.003>
- Serbina, N. V., Jia, T., Hohl, T. M., & Pamer, E. G. (2008). Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annual Review of Immunology*, 26, 421–452. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090326>
- Shaw, M. A., Clayton, D., Atkinson, S. E., Williams, H., Miller, N., Sibthorpe, D., & Blackwell, J. M. (1996). Linkage of rheumatoid arthritis to the candidate gene NRAMP1 on 2q35. *Journal of Medical Genetics*, 33(8), 672–677.
- Shi, G. L., Yang, L., Sun, Y., Yin, Y. J., & Song, C. X. (2015). MCP-1 gene polymorphisms in North Chinese patients with pulmonary tuberculosis. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 14(2), 4035–4040. <https://doi.org/10.4238/2015.April.27.18>
- da Silva, R. C., Segat, L., da Cruz, H. L. A., Schindler, H. C., Montenegro, L. M. L., Crovella, S., & Guimarães, R. L. (2014). Association of CD209 and CD209L polymorphisms with tuberculosis infection in a Northeastern Brazilian population. *Molecular Biology Reports*, 41(8), 5449–5457. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3416-y>
- Singh, A., Gaughan, J. P., & Kashyap, V. K. (2011). SLC11A1 and VDR gene variants and susceptibility to tuberculosis and disease progression in East India. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 15(11), 1468–1474. <https://doi.org/10.5588/ijtld.11.0089>
- Søborg, C., Andersen, A. B., Madsen, H. O., Kok-Jensen, A., Skinhøj, P., & Garred, P. (2002). Natural resistance-associated macrophage protein 1 polymorphisms are associated with microscopy-positive tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 186(4), 517–521. <https://doi.org/10.1086/341775>
- Søborg, C., Andersen, A. B., Range, N., Malenganisho, W., Friis, H., Magnussen, P., ... Garred, P. (2007). Influence of candidate susceptibility genes on tuberculosis in a high endemic region. *Molecular Immunology*, 44(9), 2213–2220. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.11.002>
- Soilleux, E. J., Barten, R., & Trowsdale, J. (2000). DC-SIGN; a related gene, DC-SIGNR; and CD23 form a cluster on 19p13. *Journal of Immunology*, 165(6), 2937–2942.
- Sonawane, A., Santos, J. C., Mishra, B. B., Jena, P., Progida, C., Sorensen, O. E., ... Griffiths, G. (2011). Cathelicidin is involved in the intracellular killing of mycobacteria in macrophages. *Cellular Microbiology*, 13(10), 1601–1617. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01644.x>

- Sreih, A., Ezzeddine, R., Leng, L., LaChance, A., Yu, G., Mizue, Y., ... Bucala, R. (2011). Dual effect of the macrophage migration inhibitory factor gene on the development and severity of human systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, 63(12), 3942–3951. <https://doi.org/10.1002/art.30624>
- Srivastava, K., Kant, S., & Verma, A. (2015, Winter). Role of environmental factors in transmission of tuberculosis.
- Stagas, M. K., Papaetis, G. S., Orphanidou, D., Kostopoulos, C., Syriou, S., Reczko, M., & Drakoulis, N. (2011). Polymorphisms of the NRAMP1 gene: Distribution and susceptibility to the development of pulmonary tuberculosis in the Greek population. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 17(1), PH1–PH6.
- Sutaria, N., Liu, C.-T., & Chen, T. C. (2014). Vitamin D status, receptor gene polymorphisms, and supplementation on tuberculosis: A systematic review of case-control studies and randomized controlled trials. *Journal of Clinical & Translational Endocrinology*, 1(4), 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.jcte.2014.08.001>
- Szalai, C., Duba, J., Prohászka, Z., Kalina, A., Szabó, T., Nagy, B., ... Császár, A. (2001). Involvement of polymorphisms in the chemokine system in the susceptibility for coronary artery disease (CAD). Coincidence of elevated Lp(a) and MCP-1 -2518 G/G genotype in CAD patients. *Atherosclerosis*, 158(1), 233–239.
- Tailleux, L., Schwartz, O., Herrmann, J.-L., Pivert, E., Jackson, M., Amara, A., ... Neyrolles, O. (2003). DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 197(1), 121–127.
- Takeda, K., & Akira, S. (2001). Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes to Cells*, 6(9), 733–742. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2001.00458.x>
- Takeda, K., Kaisho, T., & Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annual Review of Immunology*, 21, 335–376. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126>
- Theodoropoulos, G. E., Saridakis, V., Karantanos, T., Michalopoulos, N. V., Zagouri, F., Kontogianni, P., ... Zografos, G. C. (2012). Toll-like receptors gene polymorphisms may confer increased susceptibility to breast cancer development. *Breast*, 21(4), 534–538. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2012.04.001>
- Thuong, N. T. T., Hawin, T. R., Thwaites, G. E., Chau, T. T. H., Lan, N. T. N., Quy, H. T., ... Dunstan, S. J. (2007). A polymorphism in human TLR2 is associated with increased susceptibility to tuberculous meningitis. *Genes and Immunity*, 8(5), 422–428. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364405>
- Thye, T., Nejntsev, S., Intemann, C. D., Browne, E. N., Chinbuah, M. A., Gyapong, J., ... Meyer, C. G. (2009). MCP-1 promoter variant -362C associated with protection from pulmonary tuberculosis in Ghana, West Africa. *Human Molecular Genetics*, 18(2), 381–388. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn352>
- Thye, T., Vannberg, F. O., Wong, S. H., Owusu-Dabo, E., Osei, I., Gyapong, J., ... Hill, A. V. S. (2010). Genome-wide association analyses identifies a susceptibility locus for tuberculosis on chromosome 18q11.2. *Nature Genetics*, 42(9), 739–741. <https://doi.org/10.1038/ng.639>
- Tian, G., Li, X., Li, H., Wang, X., & Cheng, B. (2015). Systematic meta-analysis of the association between monocyte chemoattractant protein-1 -2518A/G polymorphism and risk of tuberculosis. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 14(2), 5501–5510. <https://doi.org/10.4238/2015.May.25.1>
- Tong, X., Chen, L., Liu, S., Yan, Z., Peng, S., Zhang, Y., & Fan, H. (2015). Polymorphisms in HLA-DRB1 gene and the risk of tuberculosis: A meta-analysis of 31 studies. *Lung*, 193(2), 309–318. <https://doi.org/10.1007/s00408-015-9692-z>
- Tong, X., Yan, Z., Zhou, Q., Liu, S., Han, J., Ma, Y., ... Fan, H. (2017). Association between the MIF-173G/C Polymorphism and Serum MIF levels with Pulmonary Tuberculosis: A Meta-analysis. *Scientific Reports*, 7, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00299-1>
- Trinchieri, G., Pflanz, S., & Kastelein, R. A. (2003). The IL-12 family of heterodimeric cytokines: New players in the regulation of T cell responses. *Immunity*, 19(5), 641–644.
- Tso, H. W., Lau, Y. L., Tam, C. M., Wong, H. S., & Chiang, A. K. S. (2004). Associations between IL12B polymorphisms and tuberculosis in the Hong Kong Chinese population. *The Journal of Infectious Diseases*, 190(5), 913–919. <https://doi.org/10.1086/422693>
- Vaid, M., Kaur, S., Taruna, M., Singh, H., Gupta, V., Murthy, K., & Sarma, P. (2006). Association of SP-D, MBL and I-NOS genetic variants with pulmonary tuberculosis. *Indian Journal of Human Genetics*, 12(3), 105. <https://doi.org/10.4103/0971-6866.29851>
- Vallinoto, A. C. R., Graça, E. S., Araújo, M. S., Azevedo, V. N., Cayres-Vallinoto, I., Machado, L. F. A., ... Ishak, R. (2010). IFNG +874T/A polymorphism and cytokine plasma levels are associated with susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* infection and clinical manifestation of tuberculosis. *Human Immunology*, 71(7), 692–696. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2010.03.008>
- Van Coillie, E., Van Damme, J., & Opdenakker, G. (1999). The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 10(1), 61–86.
- Vang, T., Congia, M., Macis, M. D., Musumeci, L., Orrù, V., Zavattari, P., ... Bottini, N. (2005). Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nature Genetics*, 37(12), 1317–1319. <https://doi.org/10.1038/ng1673>
- Vang, T., Landskron, J., Viken, M. K., Oberprieler, N., Torgersen, K. M., Mustelin, T., ... Lie, B. A. (2013). The autoimmune-predisposing variant of lymphoid tyrosine phosphatase favors T helper 1 responses. *Human Immunology*, 74(5), 574–585. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2012.12.017>
- Vannberg, F. O., Chapman, S. J., & Hill, A. V. S. (2011). Human genetic susceptibility to intracellular pathogens. *Immunological Reviews*, 240(1), 105–116. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00996.x>
- Vannberg, F. O., Chapman, S. J., Khor, C. C., Tosh, K., Floyd, S., Jackson-Sillah, D., ... Hill, A. V. S. (2008). CD209 genetic polymorphism and tuberculosis disease. *PLoS ONE*, 3(1), e1388. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001388>
- Vásquez-Loarte, T., Trubnykova, M., & Guio, H. (2015). Genetic association meta-analysis: A new classification to assess ethnicity using the association of MCP-1 -2518 polymorphism and tuberculosis susceptibility as a model. *BMC Genetics*, 16(1), 128. <https://doi.org/10.1186/s12863-015-0280-2>
- Veilleux, A., Latour, S., & Davidson, D. (2002). Negative regulation of immunoreceptor signaling. *Annual Review of Immunology*, 20, 669–707. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.081501.130710>
- Vejbaesya, S., Chierakul, N., Luangtrakool, P., & Sermduangprateep, C. (2007). NRAMP1 and TNF-alpha polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in Thais. *Respirology*, 12(2), 202–206. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2006.01037.x>
- Veletz Edwards, D. R., Tacconelli, A., Wejse, C., Hill, P. C., Morris, G. A. J., Edwards, T. L., ... Sirugo, G. (2012). MCP1 SNPs and pulmonary tuberculosis in cohorts from West Africa, the USA and Argentina: Lack of association or epistasis with IL12B polymorphisms. *PLoS ONE*, 7(2), e32275. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032275>
- Verreck, F. A. W., de Boer, T., Hoeve, M., van Dissel, J. T., Sanal, O., Kurimoto, M., & Ottenhoff, T. H. M. (2002). Human host defense and cytokines in mycobacterial infectious diseases: Interleukin-18 cannot compensate for genetic defects in the interleukin-12 system. *Clinical Infectious Diseases*, 35(2), 210–212. <https://doi.org/10.1086/341314>
- Walsh, K. P., & Mills, K. H. G. (2013). Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. *Trends in Immunology*, 34(11), 521–530. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.07.006>
- Wang, J., Freeman, D. J., Grundy, S. M., Levine, D. M., Guerra, R., & Cohen, J. C. (1998). Linkage between cholesterol 7alpha-hydroxylase and high plasma low-density lipoprotein cholesterol concentrations. *The Journal*

- of *Clinical Investigation*, 101(6), 1283–1291. <https://doi.org/10.1172/JCI1343>
- Wang, D., Luo, L., Chen, W., Chen, L.-Z., Zeng, W.-T., Li, W., & Huang, X.-H. (2014). Significance of the vascular endothelial growth factor and the macrophage migration inhibitory factor in the progression of hepatocellular carcinoma. *Oncology Reports*, 31(3), 1199–1204. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2946>
- Wang, J.-J., Xia, X., Tang, S.-D., Wang, J., Deng, X.-Z., Zhang, Y., & Yue, M. (2013). Meta-analysis on the associations of TLR2 gene polymorphisms with pulmonary tuberculosis susceptibility among Asian populations. *PLoS ONE*, 8(10), e75090. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075090>
- Wang, Y. L., Zhang, C. X., Shi, G. C., Zhang, Q. Y., & Liu, W. G. (2016). Correlation between genetic susceptibility of tuberculosis and macrophage migration inhibitory factor. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 30(1), 239–245.
- Wang, D., Zhou, W., Lu, S., Wang, Q., Feng, Y., Zhu, G., ... Gao, Q. (2012). Increased density of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in tuberculosis granuloma. *Experimental and Molecular Pathology*, 93(2), 207–212. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2012.05.004>
- Wejse, C., Olesen, R., Rabna, P., Kaestel, P., Gustafson, P., Aaby, P., ... Sodemann, M. (2007). Serum 25-hydroxyvitamin D in a West African population of tuberculosis patients and unmatched healthy controls. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 86(5), 1376–1383.
- WHO (2014). *WHO Global tuberculosis report 2014*. Retrieved from http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. accessed 27 October 2015.
- WHO (2015). *WHO Global tuberculosis report 2015*. Retrieved from http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. accessed 4 October 2016.
- Wilkinson, R. J., Llewellyn, M., Toossi, Z., Patel, P., Pasvol, G., Lalvani, A., ... Davidson, R. N. (2000). Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: A case-control study. *Lancet*, 355(9204), 618–621. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)02301-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)02301-6)
- Wu, L., Hu, Y., Li, D., Jiang, W., & Xu, B. (2015). Screening toll-like receptor markers to predict latent tuberculosis infection and subsequent tuberculosis disease in a Chinese population. *BMC Medical Genetics*, 16, 19. <https://doi.org/10.1186/s12881-015-0166-1>
- Wu, S.-P., Leng, L., Feng, Z., Liu, N., Zhao, H., McDonald, C., ... Bucala, R. (2006). Macrophage migration inhibitory factor promoter polymorphisms and the clinical expression of scleroderma. *Arthritis and Rheumatism*, 54(11), 3661–3669. <https://doi.org/10.1002/art.22179>
- Wu, D. J., Zhou, W., Enouz, S., Orrú, V., Stanford, S. M., Maine, C. J., ... Bottini, N. (2014). Autoimmunity-associated LYP-W620 does not impair thymic negative selection of autoreactive T cells. *PLoS ONE*, 9(2), e86677. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086677>
- Xue, Y., Zhao, Z. Q., Wang, H. J., Jin, L., Liu, C. P., Wang, Y., & Li, J. C. (2010). Toll-like receptors 2 and 4 gene polymorphisms in a southeastern Chinese population with tuberculosis. *International Journal of Immunogenetics*, 37(2), 135–138. <https://doi.org/10.1111/j.1744-313X.2009.00892.x>
- Yamada, G., Shijubo, N., Takagi-Takahashi, Y., Nishihira, J., Mizue, Y., Kikuchi, K., & Abe, S. (2002). Elevated levels of serum macrophage migration inhibitory factor in patients with pulmonary tuberculosis. *Clinical Immunology*, 104(2), 123–127.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., ... Akira, S. (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5633), 640–643. <https://doi.org/10.1126/science.1087262>
- Yao, S., & Ambrosone, C. B. (2013). Associations between vitamin D deficiency and risk of aggressive breast cancer in African-American women. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 136, 337–341. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.09.010>
- Yende, S., Angus, D. C., Kong, L., Kellum, J. A., Weissfeld, L., Ferrell, R., ... Bucala, R. (2009). The influence of macrophage migration inhibitory factor gene polymorphisms on outcome from community-acquired pneumonia. *FASEB Journal*, 23(8), 2403–2411. <https://doi.org/10.1096/fj.09-129445>
- Yi, L., Zhang, K., Mo, Y., Zhen, G., & Zhao, J. (2015). The association between CD209 gene polymorphisms and pulmonary tuberculosis susceptibility: A meta-analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(10), 12437–12445.
- Yim, J.-J., Lee, H. W., Lee, H. S., Kim, Y. W., Han, S. K., Shim, Y.-S., & Holland, S. M. (2006). The association between microsatellite polymorphisms in intron II of the human Toll-like receptor 2 gene and tuberculosis among Koreans. *Genes and Immunity*, 7(2), 150–155. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364274>
- Yuliwulandari, R., Sachrowardi, Q., Nakajima, H., Kashiwase, K., Hirayasu, K., Mabuchi, A., ... Tokunaga, K. (2010). Association of HLA-A, -B, and -DRB1 with pulmonary tuberculosis in western Javanese Indonesia. *Human Immunology*, 71(7), 697–701. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2010.04.005>
- Zhang, J., Zahir, N., Jiang, Q., Miliotis, H., Heyraud, S., Meng, X., ... Siminovich, K. A. (2011). The autoimmune disease-associated PTPN22 variant promotes calpain-mediated Lyp/Pep degradation associated with lymphocyte and dendritic cell hyperresponsiveness. *Nature Genetics*, 43(9), 902–907. <https://doi.org/10.1038/ng.904>
- Zhang, Y., Zhang, J., Zeng, L., Huang, H., Yang, M., Fu, X., ... Fan, H. (2012). The -2518A/G polymorphism in the MCP-1 gene and tuberculosis risk: A meta-analysis. *PLoS ONE*, 7(7), e38918. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038918>
- Zheng, R., Zhou, Y., Qin, L., Jin, R., Wang, J., Lu, J., ... Hu, Z. (2011). Relationship between polymorphism of DC-SIGN (CD209) gene and the susceptibility to pulmonary tuberculosis in an eastern Chinese population. *Human Immunology*, 72(2), 183–186. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2010.11.004>

How to cite this article: Qraflı M, Najimi M, Elaouad R, Sadki K. Current immunogenetic predisposition to tuberculosis in the Moroccan population. *Int J Immunogenet*. 2017;00:1–19. <https://doi.org/10.1111/iji.12340>

Bibliographie

- Abel, L., Casanova, J.-L., 2000. Genetic Predisposition to Clinical Tuberculosis: Bridging the Gap between Simple and Complex Inheritance. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 274–277.
- Abel, L., El-Baghdadi, J., Bousfiha, A.A., Casanova, J.-L., Schurr, E., 2014. Human genetics of tuberculosis: a long and winding road. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0428>
- Abel, L., Fellay, J., Haas, D.W., Schurr, E., Srikrishna, G., Urbanowski, M., Chaturvedi, N., Srinivasan, S., Johnson, D.H., Bishai, W.R., 2018. Genetics of human susceptibility to active and latent tuberculosis: present knowledge and future perspectives. *Lancet Infect. Dis.* 18, e64–e75. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30623-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30623-0)
- Adam, D., Wiegmann, K., Adam-Klages, S., Ruff, A., Krönke, M., 1996. A novel cytoplasmic domain of the p55 tumor necrosis factor receptor initiates the neutral sphingomyelinase pathway. *J. Biol. Chem.* 271, 14617–14622.
- Adam-Klages, S., Adam, D., Wiegmann, K., Struve, S., Kolanus, W., Schneider-Mergener, J., Krönke, M., 1996. FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase. *Cell* 86, 937–947.
- Adam-Klages, S., Schwandner, R., Adam, D., Kreder, D., Bernardo, K., Krönke, M., 1998. Distinct adapter proteins mediate acid versus neutral sphingomyelinase activation through the p55 receptor for tumor necrosis factor. *J. Leukoc. Biol.* 63, 678–682.
- Adamu, A.L., Crampin, A., Kayuni, N., Amberbir, A., Koole, O., Phiri, A., Nyirenda, M., Fine, P., 2017. Prevalence and risk factors for anemia severity and type in Malawian men and women: urban and rural differences. *Popul. Health Metr.* 15. <https://doi.org/10.1186/s12963-017-0128-2>
- Aguilo, J.I., Alonso, H., Uranga, S., Marinova, D., Arbués, A., Martino, A. de, Anel, A., Monzon, M., Badiola, J., Pardo, J., Brosch, R., Martin, C., 2013. ESX-1-induced apoptosis is involved in cell-to-cell spread of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell. Microbiol.* 15, 1994–2005. <https://doi.org/10.1111/cmi.12169>
- Aibana, O., Franke, M.F., Huang, C.-C., Galea, J.T., Calderon, R., Zhang, Z., Becerra, M.C., Smith, E.R., Contreras, C., Yataco, R., Lecca, L., Murray, M.B., 2018. Vitamin E Status Is Inversely Associated with Risk of Incident Tuberculosis Disease among Household Contacts. *J. Nutr.* 148, 56–62. <https://doi.org/10.1093/jn/nxx006>
- Aibana, O., Franke, M.F., Huang, C.-C., Galea, J.T., Calderon, R., Zhang, Z., Becerra, M.C., Smith, E.R., Ronnenberg, A.G., Contreras, C., Yataco, R., Lecca, L., Murray, M.B., 2017. Impact of Vitamin A and Carotenoids on the Risk of Tuberculosis Progression. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 65, 900–909. <https://doi.org/10.1093/cid/cix476>
- Alavi-Naini, R., Sharifi-Mood, B., Metanat, M., 2012. Association Between Tuberculosis and Smoking. *Int. J. High Risk Behav. Addict.* 1, 71–74. <https://doi.org/10.5812/ijhrba.5215>
- Alcaïs, A., Fieschi, C., Abel, L., Casanova, J.-L., 2005. Tuberculosis in children and adults: two distinct genetic diseases. *J. Exp. Med.* 202, 1617–1621. <https://doi.org/10.1084/jem.20052302>
- Al-Sheikh, N.M., El-Hefnway, S.M., El-Shetahy, A.A., 2018. Cholesterol 7- alpha hydroxylase gene (CYP7A1) promoter polymorphism rs3808607 as a risk factor for pulmonary tuberculosis in Egypt. *Meta Gene* 16, 66–71. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2018.01.012>
- Altare, F., Ensser, A., Breiman, A., Reichenbach, J., Baghdadi, J.E., Fischer, A., Emile, J.F., Gaillard, J.L., Meinel, E., Casanova, J.L., 2001. Interleukin-12 receptor beta1 deficiency in a patient with abdominal tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 184, 231–236. <https://doi.org/10.1086/321999>
- Anand, P.K., Kaul, D., 2005. Downregulation of TACO gene transcription restricts mycobacterial entry/survival within human macrophages. *FEMS Microbiol. Lett.* 250, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.06.056>

- Anand, P.K., Kaul, D., 2003. Vitamin D3-dependent pathway regulates TACO gene transcription. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310, 876–877.
- Anand, P.K., Kaul, D., Sharma, M., 2008. Synergistic action of vitamin D and retinoic acid restricts invasion of macrophages by pathogenic mycobacteria. *J. Microbiol. Immunol. Infect. Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi* 41, 17–25.
- Andersen, C.J., 2018. Impact of Dietary Cholesterol on the Pathophysiology of Infectious and Autoimmune Disease. *Nutrients* 10. <https://doi.org/10.3390/nu10060764>
- Arauna, L.R., Hellenthal, G., Comas, D., 2019. Dissecting human North African gene-flow into its western coastal surroundings. *Proc. R. Soc. B.*
- Arauna, L.R., Mendoza-Revilla, J., Mas-Sandoval, A., Izaabel, H., Bekada, A., Benhamamouch, S., Fadhlouli-Zid, K., Zalloua, P., Hellenthal, G., Comas, D., 2017. Recent Historical Migrations Have Shaped the Gene Pool of Arabs and Berbers in North Africa. *Mol. Biol. Evol.* 34, 318–329. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw218>
- Armstrong, A.J., Gebre, A.K., Parks, J.S., Hedrick, C.C., 2010. ATP-binding cassette transporter G1 negatively regulates thymocyte and peripheral lymphocyte proliferation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 184, 173–183. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902372>
- Arnett, E., Weaver, A.M., Woodyard, K.C., Montoya, M.J., Li, M., Hoang, K.V., Hayhurst, A., Azad, A.K., Schlesinger, L.S., 2018. PPAR γ is critical for *Mycobacterium tuberculosis* induction of Mcl-1 and limitation of human macrophage apoptosis. *PLOS Pathog.* 14, e1007100. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007100>
- Augenstein, J., Arbues, A., Simeone, R., Haanappel, E., Wegener, A., Sayes, F., Chevalier, F.L., Chalut, C., Malaga, W., Guilhot, C., Brosch, R., Astarie-Dequeker, C., 2017. ESX-1 and phthiocerol dimycocerosates of *Mycobacterium tuberculosis* act in concert to cause phagosomal rupture and host cell apoptosis. *Cell. Microbiol.* 19, e12726. <https://doi.org/10.1111/cmi.12726>
- Axelsson, M., Aly, A., Sjövall, J., 1988. Levels of 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one in plasma reflect rates of bile acid synthesis in man. *FEBS Lett.* 239, 324–328.
- Azad, A.K., Sadee, W., Schlesinger, L.S., 2012. Innate immune gene polymorphisms in tuberculosis. *Infect. Immun.* 80, 3343–3359. <https://doi.org/10.1128/IAI.00443-12>
- Baghdadi, J.E., Orlova, M., Alter, A., Ranque, B., Chentoufi, M., Lazrak, F., Archane, M.I., Casanova, J.-L., Benslimane, A., Schurr, E., Abel, L., 2006. An autosomal dominant major gene confers predisposition to pulmonary tuberculosis in adults. *J. Exp. Med.* 203, 1679–1684. <https://doi.org/10.1084/jem.20060269>
- Baig-Ansari, N., Badruddin, S.H., Karmaliani, R., Harris, H., Jehan, I., Pasha, O., Moss, N., McClure, E.M., Goldenberg, R.L., 2008. Anemia prevalence and risk factors in pregnant women in an urban area of Pakistan. *Food Nutr. Bull.* 29, 132–139.
- Balcewicz-Sablinska, M.K., Keane, J., Kornfeld, H., Remold, H.G., 1998. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF- α . *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 161, 2636–2641.
- Barral, D.C., Brenner, M.B., 2007. CD1 antigen presentation: how it works. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 929–941. <https://doi.org/10.1038/nri2191>
- Beetz, S., Wesch, D., Marischen, L., Welte, S., Oberg, H.-H., Kabelitz, D., 2008. Innate immune functions of human $\gamma\delta$ T cells. *Immunobiology* 213, 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2007.10.006>
- Behar, S.M., Martin, C.J., Booty, M.G., Nishimura, T., Zhao, X., Gan, H.-X., Divangahi, M., Remold, H.G., 2011. Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*. *Mucosal Immunol.* 4, 279–287. <https://doi.org/10.1038/mi.2011.3>
- Bensing, S.J., Bradley, M.N., Joseph, S.B., Zelcer, N., Janssen, E.M., Hausner, M.A., Shih, R., Parks, J.S., Edwards, P.A., Jamieson, B.D., Tontonoz, P., 2008. LXR signaling couples sterol

- metabolism to proliferation in the acquired immune response. *Cell* 134, 97–111. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.052>
- Bhalla, S., Ozalp, C., Fang, S., Xiang, L., Kemper, J.K., 2004. Ligand-activated pregnane X receptor interferes with HNF-4 signaling by targeting a common coactivator PGC-1 α . Functional implications in hepatic cholesterol and glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* 279, 45139–45147. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405423200>
- Bhattacharya, A., Eissa, N.T., 2015. Autophagy as a Stress Response Pathway in the Immune System. *Int. Rev. Immunol.* 34, 382–402. <https://doi.org/10.3109/08830185.2014.999156>
- Bini, E.I., Mata Espinosa, D., Marquina Castillo, B., Barrios Payán, J., Colucci, D., Cruz, A.F., Zatarain, Z.L., Alfonseca, E., Pardo, M.R., Bottasso, O., Hernández Pando, R., 2014. The influence of sex steroid hormones in the immunopathology of experimental pulmonary tuberculosis. *PloS One* 9, e93831. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093831>
- Boecke, A., Sieger, D., Neacsu, C.D., Kashkar, H., Krönke, M., 2012. Factor Associated with Neutral Sphingomyelinase Activity Mediates Navigational Capacity of Leukocytes Responding to Wounds and Infection: Live Imaging Studies in Zebrafish Larvae. *J. Immunol. Author Choice* 189, 1559–1566. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102207>
- Bogunovic, D., Byun, M., Durfee, L.A., Abhyankar, A., Sanal, O., Mansouri, D., Salem, S., Radovanovic, I., Grant, A.V., Adimi, P., Mansouri, N., Okada, S., Bryant, V.L., Kong, X.-F., Kreins, A., Velez, M.M., Boisson, B., Khalilzadeh, S., Ozcelik, U., Darazam, I.A., Schoggins, J.W., Rice, C.M., Al-Muhsen, S., Behr, M., Vogt, G., Puel, A., Bustamante, J., Gros, P., Huibregtse, J.M., Abel, L., Boisson-Dupuis, S., Casanova, J.-L., 2012. Mycobacterial disease and impaired IFN- γ immunity in humans with inherited ISG15 deficiency. *Science* 337, 1684–1688. <https://doi.org/10.1126/science.1224026>
- Boisson-Dupuis, S., El Baghdadi, J., Parvaneh, N., Bousfiha, A., Bustamante, J., Feinberg, J., Samarina, A., Grant, A.V., Janniere, L., El Hafidi, N., Hassani, A., Nolan, D., Najib, J., Camcioglu, Y., Hatipoglu, N., Aydogmus, C., Tanir, G., Aytekin, C., Keser, M., Somer, A., Aksu, G., Kutukculer, N., Mansouri, D., Mahdavian, A., Mamishi, S., Alcais, A., Abel, L., Casanova, J.-L., 2011. IL-12R β 1 deficiency in two of fifty children with severe tuberculosis from Iran, Morocco, and Turkey. *PloS One* 6, e18524. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018524>
- Boom, W.H., Canaday, D.H., Fulton, S.A., Gehring, A.J., Rojas, R.E., Torres, M., 2003. Human immunity to *M. tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing. *Tuberc. Edinb. Scotl.* 83, 98–106.
- Borgdorff, M.W., Nagelkerke, N.J., Dye, C., Nunn, P., 2000. Gender and tuberculosis: a comparison of prevalence surveys with notification data to explore sex differences in case detection. *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* 4, 123–132.
- Börtlein, C., Schumacher, F., Kleuser, B., Dölken, L., Avota, E., 2019. Role of Neutral Sphingomyelinase-2 (NSM 2) in the Control of T Cell Plasma Membrane Lipid Composition and Cholesterol Homeostasis. *Front. Cell Dev. Biol.* 7, 226. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00226>
- Botella, H., Peyron, P., Levillain, F., Poincloux, R., Poquet, Y., Brandli, I., Wang, C., Tailleux, L., Tilleul, S., Charrière, G.M., Waddell, S.J., Foti, M., Lugo-Villarino, G., Gao, Q., Maridonneau-Parini, I., Butcher, P.D., Castagnoli, P.R., Gicquel, B., de Chastellier, C., Neyrolles, O., 2011. Mycobacterial P1-Type ATPases Mediate Resistance to Zinc Poisoning in Human Macrophages. *Cell Host Microbe* 10, 248–259. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.08.006>
- Boulas, K., Talianidis, I., 2004. Functional role of G9a-induced histone methylation in small heterodimer partner-mediated transcriptional repression. *Nucleic Acids Res.* 32, 6096–6103. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh947>

- Boyle, A.P., Davis, S., Shulha, H.P., Meltzer, P., Margulies, E.H., Weng, Z., Furey, T.S., Crawford, G.E., 2008. High-Resolution Mapping and Characterization of Open Chromatin across the Genome. *Cell* 132, 311–322. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.014>
- Brighenti, S., Bergman, P., Martineau, A.R., 2018. Vitamin D and tuberculosis: where next? *J. Intern. Med.* <https://doi.org/10.1111/joim.12777>
- Brown, C.C., Esterhazy, D., Sarde, A., London, M., Pullabhatla, V., Osma-Garcia, I., Al-Bader, R., Ortiz, C., Elgueta, R., Arno, M., de Rinaldis, E., Mucida, D., Lord, G.M., Noelle, R.J., 2015. Retinoic acid is essential for Th1 cell lineage stability and prevents transition to a Th17 cell program. *Immunity* 42, 499–511. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.02.003>
- Bryk, R., Lima, C.D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Nathan, C., 2002. Metabolic enzymes of mycobacteria linked to antioxidant defense by a thioredoxin-like protein. *Science* 295, 1073–1077. <https://doi.org/10.1126/science.1067798>
- Brzostek, A., Pawelczyk, J., Rumijowska-Galewicz, A., Dziadek, B., Dziadek, J., 2009. Mycobacterium tuberculosis Is Able To Accumulate and Utilize Cholesterol. *J. Bacteriol.* 191, 6584–6591. <https://doi.org/10.1128/JB.00488-09>
- Bustamante, J., Arias, A.A., Vogt, G., Picard, C., Galicia, L.B., Prando, C., Grant, A.V., Marchal, C.C., Hubeau, M., Chapgier, A., de Beaucoudrey, L., Puel, A., Feinberg, J., Valinetz, E., Janni re, L., Besse, C., Boland, A., Brisseau, J.-M., Blanche, S., Lortholary, O., Fieschi, C., Emile, J.-F., Boisson-Dupuis, S., Al-Muhsen, S., Woda, B., Newburger, P.E., Condino-Neto, A., Dinauer, M.C., Abel, L., Casanova, J.-L., 2011a. Germline CYBB mutations that selectively affect macrophages in kindreds with X-linked predisposition to tuberculous mycobacterial disease. *Nat. Immunol.* 12, 213–221. <https://doi.org/10.1038/ni.1992>
- Bustamante, J., Picard, C., Boisson-Dupuis, S., Abel, L., Casanova, J.-L., 2011b. Genetic lessons learnt from X-linked Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1246, 92–101. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06273.x>
- Bustamante, J., Picard, C., Fieschi, C., Filipe-Santos, O., Feinberg, J., Perronne, C., Chapgier, A., de Beaucoudrey, L., Vogt, G., Sanlaville, D., Lemainque, A., Emile, J.-F., Abel, L., Casanova, J.-L., 2007. A novel X-linked recessive form of Mendelian susceptibility to mycobacterial disease. *J. Med. Genet.* 44, e65. <https://doi.org/10.1136/jmg.2006.043406>
- Byun, S., Kim, D.-H., Ryerson, D., Kim, Y.-C., Sun, H., Kong, B., Yau, P., Guo, G., Xu, H.E., Kemper, B., Kemper, J.K., 2018. Postprandial FGF19-induced phosphorylation by Src is critical for FXR function in bile acid homeostasis. *Nat. Commun.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04697-5>
- Cai, Qiang, Wang, Z.-Q., Cai, Qu, Li, C., Chen, E.-Z., Jiang, Z.-Y., 2014. Relationship between CYP7A1 -204A>C polymorphism with gallbladder stone disease and serum lipid levels: a meta-analysis. *Lipids Health Dis.* 13. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-13-126>
- Calmette, A., Boquet, A., N gre, L., 1921. Contribution   l tude du bacille tuberculeux bili . *Ann Inst Pasteur* 561-570.
- Cambier, C.J., Falkow, S., Ramakrishnan, L., 2014. Host evasion and exploitation schemes of Mycobacterium tuberculosis. *Cell* 159, 1497–1509. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.024>
- Camilleri, M., Gores, G.J., 2015. Therapeutic targeting of bile acids. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 309, G209-215. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00121.2015>
- Canaday, D.H., Wilkinson, R.J., Li, Q., Harding, C.V., Silver, R.F., Boom, W.H., 2001. CD4(+) and CD8(+) T cells kill intracellular Mycobacterium tuberculosis by a perforin and Fas/Fas ligand-independent mechanism. *J. Immunol. Baltim. Md* 167, 2734–2742.
- Caruso, A.M., Serbina, N., Klein, E., Triebold, K., Bloom, B.R., Flynn, J.L., 1999. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis. *J. Immunol. Baltim. Md* 162, 5407–5416.

- Casanova, J.-L., Abel, L., 2013. The Genetic Theory of Infectious Diseases: A Brief History and Selected Illustrations. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 14, 215–243. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091212-153448>
- Casanova, J.-L., Abel, L., 2002. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 581–620. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.081501.125851>
- Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A., Alber, G., 1996. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J. Exp. Med.* 184, 747–752.
- Cellier, M.F., Courville, P., Campion, C., 2007. Nramp1 phagocyte intracellular metal withdrawal defense. *Microbes Infect.* 9, 1662–1670. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.09.006>
- Chan, J., Flynn, J., 2004. The immunological aspects of latency in tuberculosis. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 110, 2–12.
- Chandra, R.K., 1997. Nutrition and the immune system: an introduction. *Am. J. Clin. Nutr.* 66, 460S–463S.
- Chaurasiya, S.K., Srivastava, K.K., 2009. Downregulation of protein kinase C- α enhances intracellular survival of Mycobacteria: role of PknG. *BMC Microbiol.* 9, 271. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-271>
- Chen, B., Cai, H.-R., Xue, S., You, W.-J., Liu, B., Jiang, H.-D., 2016. Bile acids induce activation of alveolar epithelial cells and lung fibroblasts through farnesoid X receptor-dependent and independent pathways. *Respirol. Carlton Vic* 21, 1075–1080. <https://doi.org/10.1111/resp.12815>
- Chen, M., Gan, H., Remold, H.G., 2006. A mechanism of virulence: virulent Mycobacterium tuberculosis strain H37Rv, but not attenuated H37Ra, causes significant mitochondrial inner membrane disruption in macrophages leading to necrosis. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 176, 3707–3716.
- Chen, Q., Gong, B., Mahmoud-Ahmed, A.S., Zhou, A., Hsi, E.D., Hussein, M., Almasan, A., 2001. Apo2L/TRAIL and Bcl-2-related proteins regulate type I interferon-induced apoptosis in multiple myeloma. *Blood* 98, 2183–2192.
- Chiang, J.Y., Kimmel, R., Weinberger, C., Stroup, D., 2000. Farnesoid X receptor responds to bile acids and represses cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription. *J. Biol. Chem.* 275, 10918–10924.
- Chiang, J.Y., Stroup, D., 1994. Identification and characterization of a putative bile acid-responsive element in cholesterol 7 α -hydroxylase gene promoter. *J. Biol. Chem.* 269, 17502–17507.
- Chiang, J.Y.L., 2013a. Bile Acid Metabolism and Signaling. *Compr. Physiol.* 3, 1191–1212. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120023>
- Chiang, J.Y.L., 2013b. Bile acid metabolism and signaling. *Compr. Physiol.* 3, 1191–1212. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120023>
- Chiang, J.Y.L., 2009. Bile acids: regulation of synthesis. *J. Lipid Res.* 50, 1955–1966. <https://doi.org/10.1194/jlr.R900010-JLR200>
- Chiang, J.Y.L., 2005. Nuclear receptor regulation of lipid metabolism: potential therapeutics for dyslipidemia, diabetes, and chronic heart and liver diseases. *Curr. Opin. Investig. Drugs Lond. Engl.* 2000 6, 994–1001.
- Chiang, J.Y.L., 2002. Bile acid regulation of gene expression: roles of nuclear hormone receptors. *Endocr. Rev.* 23, 443–463. <https://doi.org/10.1210/er.2000-0035>
- Chieppa, M., Bianchi, G., Doni, A., Del Prete, A., Sironi, M., Laskarin, G., Monti, P., Piemonti, L., Biondi, A., Mantovani, A., Introna, M., Allavena, P., 2003. Cross-linking of the mannose receptor on monocyte-derived dendritic cells activates an anti-inflammatory immunosuppressive program. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 171, 4552–4560.

- Chow, E.C.Y., Magomedova, L., Quach, H.P., Patel, R., Durk, M.R., Fan, J., Maeng, H.-J., Irondi, K., Anakk, S., Moore, D.D., Cummins, C.L., Pang, K.S., 2014. Vitamin D receptor activation down-regulates the small heterodimer partner and increases CYP7A1 to lower cholesterol. *Gastroenterology* 146, 1048–1059. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.12.027>
- Chua, J., Deretic, V., 2004. Mycobacterium tuberculosis Reprograms Waves of Phosphatidylinositol 3-Phosphate on Phagosomal Organelles. *J. Biol. Chem.* 279, 36982–36992. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405082200>
- Clay, H., Volkman, H.E., Ramakrishnan, L., 2008. Tumor necrosis factor signaling mediates resistance to mycobacteria by inhibiting bacterial growth and macrophage death. *Immunity* 29, 283–294. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.06.011>
- Clemens, D.L., Horwitz, M.A., 1995. Characterization of the Mycobacterium tuberculosis phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J. Exp. Med.* 181, 257–270.
- Cohen, J.C., Cali, J.J., Jelinek, D.F., Mehrabian, M., Sparkes, R.S., Lusi, A.J., Russell, D.W., Hobbs, H.H., 1992. Cloning of the human cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7) and localization to chromosome 8q11-q12. *Genomics* 14, 153–161.
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E., Tekaiia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S., Barrell, B.G., 1998. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature* 393, 537–544. <https://doi.org/10.1038/31159>
- Coleman, M.M., Basdeo, S.A., Coleman, A.M., Cheallagh, C.N., Peral de Castro, C., McLaughlin, A.M., Dunne, P.J., Harris, J., Keane, J., 2018. All-trans Retinoic Acid Augments Autophagy during Intracellular Bacterial Infection. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 59, 548–556. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0382OC>
- Coleman, M.M., Ruane, D., Moran, B., Dunne, P.J., Keane, J., Mills, K.H.G., 2013. Alveolar macrophages contribute to respiratory tolerance by inducing FoxP3 expression in naive T cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 48, 773–780. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2012-0263OC>
- Comstock, G.W., 1978. Tuberculosis in twins: a re-analysis of the Prophit survey. *Am. Rev. Respir. Dis.* 117, 621–624. <https://doi.org/10.1164/arrd.1978.117.4.621>
- Cooper, A.D., Chen, J., Botelho-Yetkinler, M.J., Cao, Y., Taniguchi, T., Levy-Wilson, B., 1997. Characterization of hepatic-specific regulatory elements in the promoter region of the human cholesterol 7 α -hydroxylase gene. *J. Biol. Chem.* 272, 3444–3452.
- Cooper, Andrea M., 2009. T cells in mycobacterial infection and disease. *Curr. Opin. Immunol.* 21, 378–384. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.06.004>
- Cooper, Andrea M., 2009. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 393–422. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132703>
- Copple, B.L., Li, T., 2016. Pharmacology of bile acid receptors: Evolution of bile acids from simple detergents to complex signaling molecules. *Pharmacol. Res.* 104, 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.12.007>
- Cordenonsi, M., Montagner, M., Adorno, M., Zacchigna, L., Martello, G., Mamidi, A., Soligo, S., Dupont, S., Piccolo, S., 2007. Integration of TGF- β and Ras/MAPK signaling through p53 phosphorylation. *Science* 315, 840–843. <https://doi.org/10.1126/science.1135961>
- Coudray, C., Torroni, A., Achilli, A., Pala, M., Olivieri, A., Larrouy, G., Dugoujon, J.-M., 2009. Les lignées mitochondriales et l'histoire génétique des populations berbérophones du nord de l'Afrique 63–72.

- Couture, P., Otvos, J.D., Cupples, L.A., Wilson, P.W., Schaefer, E.J., Ordovas, J.M., 1999. Association of the A-204C polymorphism in the cholesterol 7 α -hydroxylase gene with variations in plasma low density lipoprotein cholesterol levels in the Framingham Offspring Study. *J. Lipid Res.* 40, 1883–1889.
- Cowley, S.C., Elkins, K.L., 2003. CD4⁺ T cells mediate IFN-gamma-independent control of *Mycobacterium tuberculosis* infection both in vitro and in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 171, 4689–4699.
- Cox, B.E., Griffin, E.E., Ullery, J.C., Jerome, W.G., 2007. Effects of cellular cholesterol loading on macrophage foam cell lysosome acidification. *J. Lipid Res.* 48, 1012–1021. <https://doi.org/10.1194/jlr.M600390-JLR200>
- Crane, J.M., Tamm, L.K., 2004. Role of cholesterol in the formation and nature of lipid rafts in planar and spherical model membranes. *Biophys. J.* 86, 2965–2979. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74347-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74347-7)
- Crubézy, E., Ludes, B., Poveda, J.D., Clayton, J., Crouau-Roy, B., Montagnon, D., 1998. Identification of *Mycobacterium* DNA in an Egyptian Pott's disease of 5,400 years old. *C. R. Acad. Sci. III* 321, 941–951.
- Cuvillier, O., Edsall, L., Spiegel, S., 2000. Involvement of sphingosine in mitochondria-dependent Fas-induced apoptosis of type II Jurkat T cells. *J. Biol. Chem.* 275, 15691–15700. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000280200>
- Dabrowski, M.P., Peel, W.E., Thomson, A.E., 1980. Plasma membrane cholesterol regulates human lymphocyte cytotoxic function. *Eur. J. Immunol.* 10, 821–827. <https://doi.org/10.1002/eji.1830101105>
- D'Agostino, P., Milano, S., Barbera, C., Di Bella, G., La Rosa, M., Ferlazzo, V., Farruggio, R., Miceli, D.M., Miele, M., Castagnetta, L., Cillari, E., 1999. Sex hormones modulate inflammatory mediators produced by macrophages. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 876, 426–429.
- Danelishvili, L., Yamazaki, Y., Selker, J., Bermudez, L.E., 2010. Secreted *Mycobacterium tuberculosis* Rv3654c and Rv3655c proteins participate in the suppression of macrophage apoptosis. *PloS One* 5, e10474. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010474>
- Daniel, T.M., 2015. Jean-Antoine Villemin and the infectious nature of tuberculosis. *INT J TUBERC LUNG DIS* 19, 267–268 Q.
- Daniel, T.M., 2006. The history of tuberculosis. *Respir. Med.* 100, 1862–1870. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2006.08.006>
- Daniel, T.M., Iversen, P.A., 2015. Hippocrates and tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* 19, 373–374. <https://doi.org/10.5588/ijtld.14.0736>
- Darnton-Hill, I., Webb, P., Harvey, P.W.J., Hunt, J.M., Dalmiya, N., Chopra, M., Ball, M.J., Bloem, M.W., de Benoist, B., 2005. Micronutrient deficiencies and gender: social and economic costs. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 1198S–1205S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.5.1198>
- De Castro-Orós, I., Pampín, S., Cofán, M., Mozas, P., Pintó, X., Salas-Salvadó, J., Rodríguez-Rey, J.C., Ros, E., Civeira, F., Pocoví, M., 2011. Promoter variant -204A > C of the cholesterol 7 α -hydroxylase gene: association with response to plant sterols in humans and increased transcriptional activity in transfected HepG2 cells. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* 30, 239–246. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2010.07.020>
- De Fabiani, E., Mitro, N., Gilardi, F., Galmozzi, A., Caruso, D., Crestani, M., De Fabiani, E., Mitro, N., Gilardi, F., Galmozzi, A., Caruso, D., Crestani, M., 2010. When Food Meets Man: the Contribution of Epigenetics to Health. *Nutrients* 2, 551–571. <https://doi.org/10.3390/nu2050551>
- de Pee, S., Dary, O., 2002. Biochemical indicators of vitamin A deficiency: serum retinol and serum retinol binding protein. *J. Nutr.* 132, 2895S–2901S.
- Deb, C., Lee, C.-M., Dubey, V.S., Daniel, J., Abomoelak, B., Sirakova, T.D., Pawar, S., Rogers, L., Kolattukudy, P.E., 2009. A novel in vitro multiple-stress dormancy model for

- Mycobacterium tuberculosis* generates a lipid-loaded, drug-tolerant, dormant pathogen. *PLoS One* 4, e6077. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006077>
- del Castillo-Olivares, A., Gil, G., 2000. Role of FXR and FTF in bile acid-mediated suppression of cholesterol 7 α -hydroxylase transcription. *Nucleic Acids Res.* 28, 3587–3593.
- Dennis, E.A., 1997. The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem. Sci.* 22, 1–2. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(96\)20031-3](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(96)20031-3)
- Ding, L., Yang, Y., Qu, Y., Yang, T., Wang, K., Liu, W., Xia, W., 2015. Bile acid promotes liver regeneration via farnesoid X receptor signaling pathways in rats. *Mol. Med. Rep.* 11, 4431–4437. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3270>
- Dorman, S.E., Picard, C., Lammas, D., Heyne, K., van Dissel, J.T., Baretto, R., Rosenzweig, S.D., Newport, M., Levin, M., Roesler, J., Kumararatne, D., Casanova, J.-L., Holland, S.M., 2004. Clinical features of dominant and recessive interferon gamma receptor 1 deficiencies. *Lancet Lond. Engl.* 364, 2113–2121. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17552-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17552-1)
- Drover, V.A.B., Agellon, L.B., 2004. Regulation of the human cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1) by thyroid hormone in transgenic mice. *Endocrinology* 145, 574–581. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0993>
- Duarte, R., Lönnroth, K., Carvalho, C., Lima, F., Carvalho, A.C.C., Muñoz-Torrico, M., Centis, R., 2018. Tuberculosis, social determinants and co-morbidities (including HIV). *Pulmonology* 24, 115–119. <https://doi.org/10.1016/j.rppnen.2017.11.003>
- Dubos, R.J., Dubos, J., 1987. *The White Plague: Tuberculosis, Man, and Society*. Rutgers University Press.
- Durán Alert, P., Milà Villarroel, R., Formiga, F., Virgili Casas, N., Vilarasau Farré, C., 2012. Assessing risk screening methods of malnutrition in geriatric patients: Mini Nutritional Assessment (MNA) versus Geriatric Nutritional Risk Index (GNRI). *Nutr. Hosp.* 27, 590–598. <https://doi.org/10.1590/S0212-16112012000200036>
- Dutta, R.K., Kathania, M., Raje, M., Majumdar, S., 2012. IL-6 inhibits IFN- γ induced autophagy in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv infected macrophages. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 942–954. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.02.021>
- Edwards, P.A., Kast, H.R., Anisfeld, A.M., 2002. BAREing it all: the adoption of LXR and FXR and their roles in lipid homeostasis. *J. Lipid Res.* 43, 2–12.
- Ellis, E.C.S., 2006. Suppression of bile acid synthesis by thyroid hormone in primary human hepatocytes. *World J. Gastroenterol.* 12, 4640–4645.
- Eum, S.-Y., Kong, J.-H., Hong, M.-S., Lee, Y.-J., Kim, J.-H., Hwang, S.-H., Cho, S.-N., Via, L.E., Barry, C.E., 2010. Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary TB. *Chest* 137, 122–128. <https://doi.org/10.1378/chest.09-0903>
- Fang, S., 2017. Bile Acid Receptor Farnesoid X Receptor: A Novel Therapeutic Target for Metabolic Diseases. *J. Lipid Atheroscler.* 6, 1–7. <https://doi.org/10.12997/jla.2017.6.1.1>
- Fang, S., Miao, J., Xiang, L., Ponugoti, B., Treuter, E., Kemper, J.K., 2007. Coordinated recruitment of histone methyltransferase G9a and other chromatin-modifying enzymes in SHP-mediated regulation of hepatic bile acid metabolism. *Mol. Cell. Biol.* 27, 1407–1424. <https://doi.org/10.1128/MCB.00944-06>
- Fernández-Mestre, M., ngel, Takiff, H., Alcalá, F., Zhenia, 2015. NRAMP1 and VDR Gene Polymorphisms in Susceptibility to Tuberculosis in Venezuelan Population. *Dis. Markers* 2015, e860628. <https://doi.org/10.1155/2015/860628>
- Ferrari, G., Langen, H., Naito, M., Pieters, J., 1999. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell* 97, 435–447.
- Fieschi, C., Dupuis, S., Catherinot, E., Feinberg, J., Bustamante, J., Breiman, A., Altare, F., Baretto, R., Le Deist, F., Kayal, S., Koch, H., Richter, D., Brezina, M., Aksu, G., Wood, P., Al-Jumaah, S., Raspall, M., Da Silva Duarte, A.J., Tuerlinckx, D., Virelizier, J.-L., Fischer, A., Enright, A., Bernhöft, J., Cleary, A.M., Vermynen, C., Rodriguez-Gallego, C., Davies, G.,

- Blüthters-Sawatzki, R., Siegrist, C.-A., Ehlayel, M.S., Novelli, V., Haas, W.H., Levy, J., Freihorst, J., Al-Hajjar, S., Nadal, D., De Moraes Vasconcelos, D., Jeppsson, O., Kutukculer, N., Freceirova, K., Caragol, I., Lammas, D., Kumararatne, D.S., Abel, L., Casanova, J.-L., 2003. Low penetrance, broad resistance, and favorable outcome of interleukin 12 receptor beta1 deficiency: medical and immunological implications. *J. Exp. Med.* 197, 527–535.
- Filipe-Santos, O., Bustamante, J., Chappier, A., Vogt, G., de Beaucoudrey, L., Feinberg, J., Jouanguy, E., Boisson-Dupuis, S., Fieschi, C., Picard, C., Casanova, J.-L., 2006a. Inborn errors of IL-12/23- and IFN-gamma-mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features. *Semin. Immunol.* 18, 347–361. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2006.07.010>
- Filipe-Santos, O., Bustamante, J., Haverkamp, M.H., Vinolo, E., Ku, C.-L., Puel, A., Frucht, D.M., Christel, K., von Bernuth, H., Jouanguy, E., Feinberg, J., Durandy, A., Senechal, B., Chappier, A., Vogt, G., de Beaucoudrey, L., Fieschi, C., Picard, C., Garfa, M., Chemli, J., Bejaoui, M., Tsoia, M.N., Kutukculer, N., Plebani, A., Notarangelo, L., Bodemer, C., Geissmann, F., Israël, A., Véron, M., Knackstedt, M., Barbouche, R., Abel, L., Magdorf, K., Gendrel, D., Agou, F., Holland, S.M., Casanova, J.-L., 2006b. X-linked susceptibility to mycobacteria is caused by mutations in NEMO impairing CD40-dependent IL-12 production. *J. Exp. Med.* 203, 1745–1759. <https://doi.org/10.1084/jem.20060085>
- Filteau, S.M., Morris, S.S., Abbott, R.A., Tomkins, A.M., Kirkwood, B.R., Arthur, P., Ross, D.A., Gyapong, J.O., Raynes, J.G., 1993. Influence of morbidity on serum retinol of children in a community-based study in northern Ghana. *Am. J. Clin. Nutr.* 58, 192–197.
- Fish, E.N., 2008. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 737–744. <https://doi.org/10.1038/nri2394>
- Flannagan, R.S., Cosío, G., Grinstein, S., 2009. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 355–366. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2128>
- Font-Porterías, N., Solé-Morata, N., Serra-Vidal, G., Bekada, A., Fadhlou-Zid, K., Zalloua, P., Calafell, F., Comas, D., 2018. The genetic landscape of Mediterranean North African populations through complete mtDNA sequences. *Ann. Hum. Biol.* 45, 98–104. <https://doi.org/10.1080/03014460.2017.1413133>
- Forbes, J.R., Gros, P., 2001. Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol.* 9, 397–403.
- Fox, H.S., Bond, B.L., Parslow, T.G., 1991. Estrogen regulates the IFN-gamma promoter. *J. Immunol. Baltim. Md* 150, 4362–4367.
- Fratti, R.A., Chua, J., Deretic, V., 2003. Induction of p38 mitogen-activated protein kinase reduces early endosome autoantigen 1 (EEA1) recruitment to phagosomal membranes. *J. Biol. Chem.* 278, 46961–46967. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305225200>
- Gan, H., Lee, J., Ren, F., Chen, M., Kornfeld, H., Remold, H.G., 2008. Mycobacterium tuberculosis blocks crosslinking of annexin-1 and apoptotic envelope formation on infected macrophages to maintain virulence. *Nat. Immunol.* 9, 1189–1197. <https://doi.org/10.1038/ni.1654>
- Gaschignard, J., Scurr, E., Alcaïs, A., 2013. La lèpre, pilier de la génétique des maladies infectieuses. *Pathol. Biol.* 61, 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2013.03.003>
- Gatfield, J., Albrecht, I., Zanolari, B., Steinmetz, M.O., Pieters, J., 2005. Association of the leukocyte plasma membrane with the actin cytoskeleton through coiled coil-mediated trimeric coronin 1 molecules. *Mol. Biol. Cell* 16, 2786–2798. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-01-0042>
- Gatfield, J., Pieters, J., 2000. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science* 288, 1647–1650. <https://doi.org/10.1126/science.288.5471.1647>
- Gaunt, T.R., Rodríguez, S., Day, I.N., 2007. Cubic exact solutions for the estimation of pairwise haplotype frequencies: implications for linkage disequilibrium analyses and a web tool “CubeX.” *BMC Bioinformatics* 8, 428. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-428>

- George, R., Cavalcante, R., Jr, C.C., Marques, E., Waugh, J.B., Unlap, M.T., 2015. Use of siRNA molecular beacons to detect and attenuate mycobacterial infection in macrophages. *World J. Exp. Med.* 5, 164–181. <https://doi.org/10.5493/wjem.v5.i3.164>
- Ghanbari, M., Franco, O.H., de Looper, H.W.J., Hofman, A., Erkeland, S.J., Dehghan, A., 2015. Genetic Variations in MicroRNA-Binding Sites Affect MicroRNA-Mediated Regulation of Several Genes Associated With Cardio-metabolic Phenotypes. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 8, 473–486. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.114.000968>
- Ginawi, 2013. EFFECT OF ZINC AND VITAMIN A SUPPLEMENTATION ALONG WITH INTERTUBERCULAR TREATMENT IN PULMONARY TUBERCULOSIS IN NORTH INDIAN PATIENTS.
- Gobin, J., Horwitz, M.A., 1996. Exochelins of *Mycobacterium tuberculosis* remove iron from human iron-binding proteins and donate iron to mycobactins in the *M. tuberculosis* cell wall. *J. Exp. Med.* 183, 1527–1532. <https://doi.org/10.1084/jem.183.4.1527>
- Goodwin, B., Jones, S.A., Price, R.R., Watson, M.A., McKee, D.D., Moore, L.B., Galardi, C., Wilson, J.G., Lewis, M.C., Roth, M.E., Maloney, P.R., Willson, T.M., Klierer, S.A., 2000. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol. Cell* 6, 517–526.
- Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Herrero-Barbudo, C., Blanco-Navarro, I., Blázquez-García, S., Pérez-Sacristán, B., 2006. Simultaneous determination of vitamins A, E and 25-OH-vitamin D: application in clinical assessments. *Clin. Biochem.* 39, 180–182. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.11.004>
- Grant, A.V., El Baghdadi, J., Sabri, A., El Azbaoui, S., Alaoui-Tahiri, K., Abderrahmani Rhorfi, I., Gharbaoui, Y., Abid, A., Benkirane, M., Raharimanga, V., Richard, V., Orlova, M., Boland, A., Migaud, M., Okada, S., Nolan, D.K., Bustamante, J., Barreiro, L.B., Schurr, E., Boisson-Dupuis, S., Rasolof, V., Casanova, J.-L., Abel, L., 2013. Age-dependent association between pulmonary tuberculosis and common TOX variants in the 8q12-13 linkage region. *Am. J. Hum. Genet.* 92, 407–414. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.01.013>
- Greenwood, C.M.T., Fujiwara, T.M., Boothroyd, L.J., Miller, M.A., Frappier, D., Fanning, E.A., Schurr, E., Morgan, K., 2000. Linkage of Tuberculosis to Chromosome 2q35 Loci, Including NRAMP1, in a Large Aboriginal Canadian Family. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 405–416.
- Griffin, J.E., Gawronski, J.D., Dejesus, M.A., Ioerger, T.R., Akerley, B.J., Sassetti, C.M., 2011. High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism. *PLoS Pathog.* 7, e1002251. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002251>
- Griffin, J.E., Pandey, A.K., Gilmore, S.A., Mizrahi, V., McKinney, J.D., Bertozzi, C.R., Sassetti, C.M., 2012. Cholesterol catabolism by *Mycobacterium tuberculosis* requires transcriptional and metabolic adaptations. *Chem. Biol.* 19, 218–227. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.12.016>
- Guéguen, Y., Mouzat, K., Ferrari, L., Tissandie, E., Lobaccaro, J.M.A., Batt, A.-M., Paquet, F., Voisin, P., Aigueperse, J., Gourmelon, P., Souidi, M., 2006. Les cytochromes P450 : métabolisme des xénobiotiques, régulation et rôle en clinique. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 64, 535–548. <https://doi.org/10.1684/abc.2006.0015>
- Guengrich, P.R.O. de (Ed.), 2005. Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry, 3rd ed. Springer US.
- Guerra-Silveira, F., Abad-Franch, F., 2013. Sex bias in infectious disease epidemiology: patterns and processes. *PloS One* 8, e62390. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062390>
- Guirado, E., Schlesinger, L.S., 2013. Modeling the *Mycobacterium tuberculosis* Granuloma – the Critical Battlefield in Host Immunity and Disease. *Front. Immunol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00098>

- Guo, Y., Brown, C., Ortiz, C., Noelle, R.J., 2015. Leukocyte homing, fate, and function are controlled by retinoic acid. *Physiol. Rev.* 95, 125–148. <https://doi.org/10.1152/physrev.00032.2013>
- Gupta, K.B., Gupta, R., Atreja, A., Verma, M., Vishvkarma, S., 2009. Tuberculosis and nutrition. *Lung India Off. Organ Indian Chest Soc.* 26, 9–16. <https://doi.org/10.4103/0970-2113.45198>
- Gupta, S., Stravitz, R.T., Dent, P., Hylemon, P.B., 2001. Down-regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) gene expression by bile acids in primary rat hepatocytes is mediated by the c-Jun N-terminal kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 15816–15822. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010878200>
- Gutierrez, M.G., Master, S.S., Singh, S.B., Taylor, G.A., Colombo, M.I., Deretic, V., 2004. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell* 119, 753–766. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.038>
- Hagiwara, T., Kono, S., Yin, G., Toyomura, K., Nagano, J., Mizoue, T., Mibu, R., Tanaka, M., Kakeji, Y., Maehara, Y., Okamura, T., Ikejiri, K., Futami, K., Yasunami, Y., Maekawa, T., Takenaka, K., Ichimiya, H., Imaizumi, N., 2005a. Genetic polymorphism in cytochrome P450 7A1 and risk of colorectal cancer: the Fukuoka Colorectal Cancer Study. *Cancer Res.* 65, 2979–2982. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3872>
- Hagiwara, T., Kono, S., Yin, G., Toyomura, K., Nagano, J., Mizoue, T., Mibu, R., Tanaka, M., Kakeji, Y., Maehara, Y., Okamura, T., Ikejiri, K., Futami, K., Yasunami, Y., Maekawa, T., Takenaka, K., Ichimiya, H., Imaizumi, N., 2005b. Genetic polymorphism in cytochrome P450 7A1 and risk of colorectal cancer: the Fukuoka Colorectal Cancer Study. *Cancer Res.* 65, 2979–2982. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3872>
- Hall, J.A., Cannons, J.L., Grainger, J.R., Santos, L.M.D., Hand, T.W., Naik, S., Wohlfert, E.A., Chou, D.B., Oldenhove, G., Robinson, M., Grigg, M.E., Kastenmayer, R., Schwartzberg, P.L., Belkaid, Y., 2011. Essential role for retinoic acid in the promotion of CD4⁺ T cell effector responses via retinoic acid receptor α . *Immunity* 34, 435–447. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.003>
- Hambleton, S., Salem, S., Bustamante, J., Bigley, V., Boisson-Dupuis, S., Azevedo, J., Fortin, A., Haniffa, M., Ceron-Gutierrez, L., Bacon, C.M., Menon, G., Trouillet, C., McDonald, D., Carey, P., Ginhoux, F., Alsina, L., Zumwalt, T.J., Kong, X.-F., Kumararatne, D., Butler, K., Hubeau, M., Feinberg, J., Al-Muhsen, S., Cant, A., Abel, L., Chaussabel, D., Doffinger, R., Talesnik, E., Grumach, A., Duarte, A., Abarca, K., Moraes-Vasconcelos, D., Burk, D., Berghuis, A., Geissmann, F., Collin, M., Casanova, J.-L., Gros, P., 2011. IRF8 mutations and human dendritic-cell immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 365, 127–138. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1100066>
- Hamid Salim, M.A., Declercq, E., Van Deun, A., Saki, K. a. R., 2004. Gender differences in tuberculosis: a prevalence survey done in Bangladesh. *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* 8, 952–957.
- Han, C.Y., 2018. Update on FXR Biology: Promising Therapeutic Target? *Int. J. Mol. Sci.* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19072069>
- Han, S., Chiang, J.Y.L., 2009. Mechanism of vitamin D receptor inhibition of cholesterol 7 α -hydroxylase gene transcription in human hepatocytes. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 37, 469–478. <https://doi.org/10.1124/dmd.108.025155>
- Harding, C.V., Boom, W.H., 2010. Regulation of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*: a role for Toll-like receptors. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, nrmicro2321. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2321>
- Haubert, D., Gharib, N., Rivero, F., Wiegmann, K., Hösel, M., Krönke, M., Kashkar, H., 2007. PtdIns(4,5)P-restricted plasma membrane localization of FAN is involved in TNF-induced actin reorganization. *EMBO J.* 26, 3308–3321. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601778>

- He, F., Li, J., Mu, Y., Kuruba, R., Ma, Z., Wilson, A., Alber, S., Jiang, Y., Stevens, T., Watkins, S., Pitt, B., Xie, W., Li, S., 2006. Downregulation of endothelin-1 by farnesoid X receptor in vascular endothelial cells. *Circ. Res.* 98, 192–199. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000200400.55539.85>
- Hegele, R.A., Wang, J., Harris, S.B., Brunt, J.H., Young, T.K., Hanley, A.J., Zinman, B., Connelly, P.W., Anderson, C.M., 2001. Variable association between genetic variation in the CYP7 gene promoter and plasma lipoproteins in three Canadian populations. *Atherosclerosis* 154, 579–587.
- Heiniger, H.J., Marshall, J.D., 1982. Cholesterol synthesis in polyclonally activated cytotoxic lymphocytes and its requirement for differentiation and proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 3823–3827.
- Hendrick, S.M., Mroz, M.S., Greene, C.M., Keely, S.J., Harvey, B.J., 2014. Bile acids stimulate chloride secretion through CFTR and calcium-activated Cl⁻ channels in Calu-3 airway epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 307, L407–418. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00352.2013>
- Henn, B.M., Botigué, L.R., Gravel, S., Wang, W., Brisbin, A., Byrnes, J.K., Fadhlouzi-Zid, K., Zalloua, P.A., Moreno-Estrada, A., Bertranpetit, J., Bustamante, C.D., Comas, D., 2012. Genomic Ancestry of North Africans Supports Back-to-Africa Migrations. *PLOS Genet* 8, e1002397. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002397>
- Hmama, Z., Peña-Díaz, S., Joseph, S., Av-Gay, Y., 2015. Immuno-evasion and immunosuppression of the macrophage by Mycobacterium tuberculosis. *Immunol. Rev.* 264, 220–232. <https://doi.org/10.1111/imr.12268>
- Hofman, M.K., Groenendijk, M., Verkuiljen, P.J.J.H., Jonkers, I.J. a. M., Mohrschladt, M.F., Smelt, A.H.M., Princen, H.M.G., 2004. Modulating effect of the A-278C promoter polymorphism in the cholesterol 7 α -hydroxylase gene on serum lipid levels in normolipidaemic and hypertriglyceridaemic individuals. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 12, 935–941. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201236>
- Hofman, M.K., Princen, H.M.G., Zwinderman, A.H., Jukema, J.W., 2005. Genetic variation in the rate-limiting enzyme in cholesterol catabolism (cholesterol 7 α -hydroxylase) influences the progression of atherosclerosis and risk of new clinical events. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 108, 539–545. <https://doi.org/10.1042/CS20040339>
- Holmes, C.B., Hausler, H., Nunn, P., 1998. A review of sex differences in the epidemiology of tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* 2, 96–104.
- Honda, A., Yamashita, K., Numazawa, M., Ikegami, T., Doy, M., Matsuzaki, Y., Miyazaki, H., 2007. Highly sensitive quantification of 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one in human serum by LC-ESI-MS/MS. *J. Lipid Res.* 48, 458–464. <https://doi.org/10.1194/jlr.D600032-JLR200>
- Houben, D., Demangel, C., Ingen, J. van, Perez, J., Baldeón, L., Abdallah, A.M., Caleechurn, L., Bottai, D., Zon, M. van, Punder, K. de, Laan, T. van der, Kant, A., Vries, R.B., Willemsen, P., Bitter, W., Soolingen, D. van, Brosch, R., Wel, N. van der, Peters, P.J., 2012. ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria. *Cell. Microbiol.* 14, 1287–1298. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01799.x>
- Houben, E.N.G., Walburger, A., Ferrari, G., Nguyen, L., Thompson, C.J., Miess, C., Vogel, G., Mueller, B., Pieters, J., 2009. Differential expression of a virulence factor in pathogenic and non-pathogenic mycobacteria. *Mol. Microbiol.* 72, 41–52. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06612.x>
- Hsu, H., Huang, J., Shu, H.B., Baichwal, V., Goeddel, D.V., 1996. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* 4, 387–396.
- Hsu, T., Hingley-Wilson, S.M., Chen, B., Chen, M., Dai, A.Z., Morin, P.M., Marks, C.B., Padiyar, J., Goulding, C., Gingery, M., Eisenberg, D., Russell, R.G., Derrick, S.C., Collins, F.M., Morris, S.L., King, C.H., Jacobs, W.R., 2003. The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial

- tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 12420–12425. <https://doi.org/10.1073/pnas.1635213100>
- Hu, Q., Chen, Z., Liang, G., Mo, F., Zhang, H., Xu, S., Wang, Y., Kang, L., Jin, T., 2016. Vitamin D receptor gene associations with pulmonary tuberculosis in a Tibetan Chinese population. *BMC Infect. Dis.* 16, 469. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1699-4>
- Inagaki, T., Choi, M., Moschetta, A., Peng, L., Cummins, C.L., McDonald, J.G., Luo, G., Jones, S.A., Goodwin, B., Richardson, J.A., Gerard, R.D., Repa, J.J., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A., 2005. Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab.* 2, 217–225. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.09.001>
- Intemann, C.D., Thye, T., Niemann, S., Browne, E.N.L., Amanua Chinbuah, M., Enimil, A., Gyapong, J., Osei, I., Owusu-Dabo, E., Helm, S., Rüsch-Gerdes, S., Horstmann, R.D., Meyer, C.G., 2009. Autophagy gene variant IRGM -261T contributes to protection from tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* but not by *M. africanum* strains. *PLoS Pathog.* 5, e1000577. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000577>
- Ito, H., Matsuo, K., Hosono, S., Watanabe, M., Kawase, T., Suzuki, T., Hirai, T., Yatabe, Y., Tanaka, H., Tajima, K., 2010. Association between CYP7A1 and the risk of proximal colon cancer in Japanese. *Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.* 1, 35–46.
- Iwanicki, T., Balcerzyk, A., Niemiec, P., Nowak, T., Ochalska-Tyka, A., Krauze, J., Kosiorz-Gorczyńska, S., Grzeszczak, W., Zak, I., 2015. CYP7A1 Gene Polymorphism Located in the 5' Upstream Region Modifies the Risk of Coronary Artery Disease. *Dis. Markers* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/185969>
- Jahn, D., Sutor, D., Dorbath, D., Weiß, J., Götze, O., Schmitt, J., Hermanns, H.M., Geier, A., 2016. Farnesoid X receptor-dependent and -independent pathways mediate the transcriptional control of human fibroblast growth factor 19 by vitamin A. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* 1859, 381–392. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.12.007>
- Jayachandran, R., Sundaramurthy, V., Combaluzier, B., Mueller, P., Korf, H., Huygen, K., Miyazaki, T., Albrecht, I., Massner, J., Pieters, J., 2007. Survival of mycobacteria in macrophages is mediated by coronin 1-dependent activation of calcineurin. *Cell* 130, 37–50. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.043>
- Jiang, Z.-Y., Han, T.-Q., Suo, G.-J., Feng, D.-X., Chen, S., Cai, X.-X., Jiang, Z.-H., Shang, J., Zhang, Y., Jiang, Y., Zhang, S.-D., 2004. Polymorphisms at cholesterol 7 α -hydroxylase, apolipoproteins B and E and low density lipoprotein receptor genes in patients with gallbladder stone disease. *World J. Gastroenterol.* 10, 1508–1512. <https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i10.1508>
- Jiménez-Corona, M., García-García, L., DeRiemer, K., Ferreyra-Reyes, L., Bobadilla-del-Valle, M., Cano-Arellano, B., Canizales-Quintero, S., Martínez-Gamboa, A., Small, P.M., Sifuentes-Osornio, J., Ponce-de-León, A., 2006. Gender differentials of pulmonary tuberculosis transmission and reactivation in an endemic area. *Thorax* 61, 348–353. <https://doi.org/10.1136/thx.2005.049452>
- Jo, E.-K., 2008. Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs, C-type lectins, and NLRs. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21, 279–286. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3282f88b5d>
- Jo, E.-K., Yang, C.-S., Choi, C.H., Harding, C.V., 2007. Intracellular signalling cascades regulating innate immune responses to Mycobacteria: branching out from Toll-like receptors. *Cell. Microbiol.* 9, 1087–1098. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00914.x>
- Jogl, G., Shen, Y., Gebauer, D., Li, J., Wiegmann, K., Kashkar, H., Krönke, M., Tong, L., 2002. Crystal structure of the BEACH domain reveals an unusual fold and extensive association with a novel PH domain. *EMBO J.* 21, 4785–4795.
- Jouanguy, E., Altare, F., Lamhamedi-Cherradi, S., Casanova, J.L., 1997. Infections in IFNGR-1-deficient children. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* 17, 583–587. <https://doi.org/10.1089/jir.1997.17.583>

- Junaid, K., Rehman, A., 2019. Impact of vitamin D on infectious disease-tuberculosis-a review. *Clin. Nutr. Exp.* 25, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.yclnex.2019.02.003>
- Juřica, J., Dovrtělová, G., Nosková, K., Zendulka, O., 2016. Bile acids, nuclear receptors and cytochrome P450. *Physiol. Res.* 65, S427–S440.
- Kai, Y., Qiang, C., Xinxin, P., Miaomiao, Z., Kuailu, L., 2015. Decreased miR-154 expression and its clinical significance in human colorectal cancer. *World J. Surg. Oncol.* 13, 195. <https://doi.org/10.1186/s12957-015-0607-5>
- Karyadi, E., Schultink, W., Nelwan, R.H.H., Gross, R., Amin, Z., Dolmans, W.M.V., Meer, J.W.M. van der, Hautvast, J.G.A.J., West, C.E., 2000. Poor Micronutrient Status of Active Pulmonary Tuberculosis Patients in Indonesia. *J. Nutr.* 130, 2953–2958.
- Katona, P., Katona-Apte, J., 2008. The Interaction between Nutrition and Infection. *Clin. Infect. Dis.* 46, 1582–1588. <https://doi.org/10.1086/587658>
- Kaufmann, S.H.E., 2004. New issues in tuberculosis. *Ann. Rheum. Dis.* 63 Suppl 2, ii50–ii56. <https://doi.org/10.1136/ard.2004.028258>
- Kaufmann, S.H.E., McMichael, A.J., 2005. Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. *Nat. Med.* 11, S33–44. <https://doi.org/10.1038/nm1221>
- Kawai, T., Akira, S., 2006. TLR signaling. *Cell Death Differ.* 13, 816–825. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401850>
- Keflie, T.S., Samuel, A., Woldegiorgis, A.Z., Mihret, A., Abebe, M., Biesalski, H.K., 2018. Vitamin A and zinc deficiencies among tuberculosis patients in Ethiopia. *J. Clin. Tuberc. Mycobact. Dis.* 12, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.jctube.2018.05.002>
- Kemper, J.K., Kim, H., Miao, J., Bhalla, S., Bae, Y., 2004. Role of an mSin3A-Swi/Snf chromatin remodeling complex in the feedback repression of bile acid biosynthesis by SHP. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7707–7719. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.17.7707-7719.2004>
- Kieser, K.J., Rubin, E.J., 2014. How sisters grow apart: mycobacterial growth and division. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 550–562. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3299>
- Kim, B.-R., Kim, Byoung-Jun, Kook, Y.-H., Kim, Bum-Joon, 2019. Phagosome Escape of Rough Mycobacterium abscessus Strains in Murine Macrophage via Phagosomal Rupture Can Lead to Type I Interferon Production and Their Cell-To-Cell Spread. *Front. Immunol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00125>
- Kim, E.W., De Leon, A., Jiang, Z., Radu, R.A., Martineau, A.R., Chan, E.D., Bai, X., Su, W.-L., Montoya, D.J., Modlin, R.L., Liu, P.T., 2019. Vitamin A Metabolism by Dendritic Cells Triggers an Antimicrobial Response against Mycobacterium tuberculosis. *mSphere* 4. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00327-19>
- Kim, H.J., Park, H.-Y., Kim, E., Lee, K.-S., Kim, K.-K., Choi, B.-O., Kim, S.M., Bae, J.S., Lee, S.O., Chun, J.Y., Park, T.J., Cheong, H.S., Jo, I., Shin, H.D., 2010. Common CYP7A1 promoter polymorphism associated with risk of neuromyelitis optica. *Neurobiol. Dis.* 37, 349–355. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.10.013>
- Klein, S.L., Flanagan, K.L., 2016. Sex differences in immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 626–638. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.90>
- Klein, S.L., Marriott, I., Fish, E.N., 2015. Sex-based differences in immune function and responses to vaccination. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 109, 9–15. <https://doi.org/10.1093/trstmh/tru167>
- Kliwer, S.A., Mangelsdorf, D.J., 2015. Bile Acids as Hormones: The FXR-FGF15/19 Pathway. *Dig. Dis. Basel Switz.* 33, 327–331. <https://doi.org/10.1159/000371670>
- Klingenberg, M., 1958. Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 75, 376–386.
- Knechel, N.A., 2009. Tuberculosis: pathophysiology, clinical features, and diagnosis. *Crit. Care Nurse* 29, 34–43; quiz 44. <https://doi.org/10.4037/ccn2009968>
- Koch, R., 1882. Die Ätiologie der Tuberkulose 15, 221–230. <http://dx.doi.org/10.25646/5088>

- Koo, M.-S., Subbian, S., Kaplan, G., 2012. Strain specific transcriptional response in *Mycobacterium tuberculosis* infected macrophages. *Cell Commun. Signal.* CCS 10, 2. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-10-2>
- Koul, A., Herget, T., Klebl, B., Ullrich, A., 2004. Interplay between mycobacteria and host signalling pathways. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 189–202. <https://doi.org/10.1038/nrmicro840>
- Ková, J., Suchánek, P., Hubá, J.A., Poledne, R., 2004. The A-204C Polymorphism in the Cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) Gene Determines the Cholesterolemia Responsiveness to a High-Fat Diet. *Physiol Res* 53, 565–568.
- Koyanagi, A., Kuffó, D., Gresely, L., Shenkin, A., Cuevas, L.E., 2004. Relationships between serum concentrations of C-reactive protein and micronutrients, in patients with tuberculosis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 98, 391–399. <https://doi.org/10.1179/000349804225003424>
- Kreder, D., Krut, O., Adam-Klages, S., Wiegmann, K., Scherer, G., Plitz, T., Jensen, J.M., Proksch, E., Steinmann, J., Pfeffer, K., Krönke, M., 1999a. Impaired neutral sphingomyelinase activation and cutaneous barrier repair in FAN-deficient mice. *EMBO J.* 18, 2472–2479. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.9.2472>
- Kreder, D., Krut, O., Adam-Klages, S., Wiegmann, K., Scherer, G., Plitz, T., Jensen, J.M., Proksch, E., Steinmann, J., Pfeffer, K., Krönke, M., 1999b. Impaired neutral sphingomyelinase activation and cutaneous barrier repair in FAN-deficient mice. *EMBO J.* 18, 2472–2479. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.9.2472>
- Krut, O., Wiegmann, K., Kashkar, H., Yazdanpanah, B., Krönke, M., 2006. Novel tumor necrosis factor-responsive mammalian neutral sphingomyelinase-3 is a C-tail-anchored protein. *J. Biol. Chem.* 281, 13784–13793. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511306200>
- Kuballa, P., Nolte, W.M., Castoreno, A.B., Xavier, R.J., 2012. Autophagy and the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 611–646. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074948>
- Kusner, D.J., 2005. Mechanisms of mycobacterial persistence in tuberculosis. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 114, 239–247. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2004.07.016>
- Lam, A., Prabhu, R., Gross, C.M., Riesenberger, L.A., Singh, V., Aggarwal, S., 2017. Role of apoptosis and autophagy in tuberculosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 313, L218–L229. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00162.2017>
- Lambert, G., Amar, M.J.A., Guo, G., Brewer, H.B., Gonzalez, F.J., Sinal, C.J., 2003. The farnesoid X-receptor is an essential regulator of cholesterol homeostasis. *J. Biol. Chem.* 278, 2563–2570. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209525200>
- Lambrinoudaki, I.V., Kaparos, G.I., Vlachou, S.A., Stamatelopoulos, K.S., Georgiopoulos, G.A., Sergeantanis, T.N., Panoulis, C.P., Christodoulakos, G.E., Alexandrou, A.P., Kouskouni, E.E., Creatsa, M.G., Papamichael, C.M., 2008. CYP A-204C polymorphism is associated with subclinical atherosclerosis in postmenopausal women. *Menopause N. Y. N* 15, 1163–1168. <https://doi.org/10.1097/gme.0b013e31817727c3>
- Lamkanfi, M., Dixit, V.M., 2010. Manipulation of host cell death pathways during microbial infections. *Cell Host Microbe* 8, 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.06.007>
- Lee, J., Remold, H.G., Jeong, M.H., Kornfeld, H., 2006. Macrophage apoptosis in response to high intracellular burden of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by a novel caspase-independent pathway. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 176, 4267–4274. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.7.4267>
- Lee, R.E.B., Li, W., Chatterjee, D., Lee, R.E., 2005. Rapid structural characterization of the arabinogalactan and lipoarabinomannan in live mycobacterial cells using 2D and 3D HR-MAS NMR: structural changes in the arabinan due to ethambutol treatment and gene mutation are observed. *Glycobiology* 15, 139–151. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwh150>
- Lee, W., VanderVen, B.C., Fahey, R.J., Russell, D.G., 2013. Intracellular *Mycobacterium tuberculosis* exploits host-derived fatty acids to limit metabolic stress. *J. Biol. Chem.* 288, 6788–6800. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.445056>

- Leung, C.C., Yew, W.W., Chan, C.K., Chang, K.C., Law, W.S., Lee, S.N., Tai, L.B., Leung, E.C.C., Au, R.K.F., Huang, S.S., Tam, C.M., 2015. Smoking adversely affects treatment response, outcome and relapse in tuberculosis. *Eur. Respir. J.* 45, 738–745. <https://doi.org/10.1183/09031936.00114214>
- Levade, T., Jaffrézou, J.P., 1999. Signalling sphingomyelinases: which, where, how and why? *Biochim. Biophys. Acta* 1438, 1–17.
- Levin, K.A., 2006. Study design V. Case-control studies. *Evid. Based Dent.* 7, 83–84. <https://doi.org/10.1038/sj.ebd.6400436>
- Li, C., Peng, H., Japtok, L., Seitz, A., Riehle, A., Wilker, B., Soddemann, M., Kleuser, B., Edwards, M., Lammas, D., Zhang, Y., Gulbins, E., Grassme, H., 2016. Inhibition of neutral sphingomyelinase protects mice against systemic tuberculosis. *Front. Biosci. Elite Ed.* 8, 311–325.
- Li, T., Chanda, D., Zhang, Y., Choi, H.-S., Chiang, J.Y.L., 2010. Glucose stimulates cholesterol 7 α -hydroxylase gene transcription in human hepatocytes. *J. Lipid Res.* 51, 832–842. <https://doi.org/10.1194/jlr.M002782>
- Li, T., Chiang, J.Y.L., 2014a. Bile Acid Signaling in Metabolic Disease and Drug Therapy. *Pharmacol. Rev.* 66, 948–983. <https://doi.org/10.1124/pr.113.008201>
- Li, T., Chiang, J.Y.L., 2014b. Bile Acid Signaling in Metabolic Disease and Drug Therapy. *Pharmacol. Rev.* 66, 948–983. <https://doi.org/10.1124/pr.113.008201>
- Li, T., Chiang, J.Y.L., 2007. A novel role of transforming growth factor β 1 in transcriptional repression of human cholesterol 7 α -hydroxylase gene. *Gastroenterology* 133, 1660–1669. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.08.042>
- Li, T., Chiang, J.Y.L., 2005. Mechanism of rifampicin and pregnane X receptor inhibition of human cholesterol 7 α -hydroxylase gene transcription. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288, G74–84. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00258.2004>
- Li, T., Jahan, A., Chiang, J.Y.L., 2006a. Bile acids and cytokines inhibit the human cholesterol 7 α -hydroxylase gene via the JNK/c-jun pathway in human liver cells. *Hepatology* 43, 1202–1210. <https://doi.org/10.1002/hep.21183>
- Li, T., Kong, X., Owsley, E., Ellis, E., Strom, S., Chiang, J.Y.L., 2006b. Insulin regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase expression in human hepatocytes: roles of forkhead box O1 and sterol regulatory element-binding protein 1c. *J. Biol. Chem.* 281, 28745–28754. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605815200>
- Li, T., Matozel, M., Boehme, S., Kong, B., Nilsson, L.-M., Guo, G., Ellis, E., Chiang, J.Y.L., 2011. Overexpression of cholesterol 7 α -hydroxylase promotes hepatic bile acid synthesis and secretion and maintains cholesterol homeostasis. *Hepatology* 53, 996–1006. <https://doi.org/10.1002/hep.24107>
- Li, X., Yang, Y., Zhou, F., Zhang, Y., Lu, H., Jin, Q., Gao, L., 2011. SLC11A1 (NRAMP1) polymorphisms and tuberculosis susceptibility: updated systematic review and meta-analysis. *PloS One* 6, e15831. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015831>
- Li, Z., Kelley, C., Collins, F., Rouse, D., Morris, S., 1998. Expression of katG in Mycobacterium tuberculosis is associated with its growth and persistence in mice and guinea pigs. *J. Infect. Dis.* 177, 1030–1035.
- Li-Hawkins, J., Gåfvels, M., Olin, M., Lund, E.G., Andersson, U., Schuster, G., Björkhem, I., Russell, D.W., Eggertsen, G., 2002. Cholic acid mediates negative feedback regulation of bile acid synthesis in mice. *J. Clin. Invest.* 110, 1191–1200. <https://doi.org/10.1172/JCI16309>
- Lin, X., Yang, Z., Zhang, P., Shao, G., 2015. miR-154 suppresses non-small cell lung cancer growth in vitro and in vivo. *Oncol. Rep.* 33, 3053–3060. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3895>
- Liu, H., Ferrell, J., Boehme, S., Chiang, J., 2016. Cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) plays a critical role in preventing hepatic inflammation and fibrosis. *FASEB J.* 30, 934.1–934.1. https://doi.org/10.1096/fasebj.30.1_supplement.934.1

- Liu, P.T., Stenger, S., Li, H., Wenzel, L., Tan, B.H., Krutzik, S.R., Ochoa, M.T., Schaubert, J., Wu, K., Meinken, C., Kamen, D.L., Wagner, M., Bals, R., Steinmeyer, A., Zügel, U., Gallo, R.L., Eisenberg, D., Hewison, M., Hollis, B.W., Adams, J.S., Bloom, B.R., Modlin, R.L., 2006. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 311, 1770–1773. <https://doi.org/10.1126/science.1123933>
- Locht, C., 2016. La tuberculose, une histoire toujours d'actualité. *médecine/sciences* 32, 535–536. <https://doi.org/10.1051/medsci/20163206001>
- Lönnroth, K., Castro, K.G., Chakaya, J.M., Chauhan, L.S., Floyd, K., Glaziou, P., Ravigliione, M.C., 2010. Tuberculosis control and elimination 2010–50: cure, care, and social development. *Lancet Lond. Engl.* 375, 1814–1829. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60483-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60483-7)
- Lotter, H., Helk, E., Bernin, H., Jacobs, T., Prehn, C., Adamski, J., González-Roldán, N., Holst, O., Tannich, E., 2013. Testosterone increases susceptibility to amebic liver abscess in mice and mediates inhibition of IFN γ secretion in natural killer T cells. *PloS One* 8, e55694. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055694>
- Lü, H.-Z., Zhu, A.-Y., Chen, Y., Tang, J., Li, B.-Q., 2011. Formation and aggregation of lipid rafts in $\gamma\delta$ T cells following stimulation with Mycobacterium tuberculosis antigens. *Tohoku J. Exp. Med.* 223, 193–198.
- Lu, T.T., Makishima, M., Repa, J.J., Schoonjans, K., Kerr, T.A., Auwerx, J., Mangelsdorf, D.J., 2000. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol. Cell* 6, 507–515.
- Ma, Z., Lienhardt, C., McIlleron, H., Nunn, A.J., Wang, X., 2010. Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality. *Lancet Lond. Engl.* 375, 2100–2109. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60359-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60359-9)
- Maeda, Y., Seidel, S.D., Wei, G., Liu, X., Sladek, F.M., 2002. Repression of hepatocyte nuclear factor 4 α tumor suppressor p53: involvement of the ligand-binding domain and histone deacetylase activity. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 16, 402–410. <https://doi.org/10.1210/mend.16.2.0769>
- Mahasirimongkol, S., Yanai, H., Mushiroda, T., Promphittayarat, W., Wattanapokayakit, S., Phromjai, J., Yuliwulandari, R., Wichukchinda, N., Yowang, A., Yamada, N., Kantipong, P., Takahashi, A., Kubo, M., Sawanpanyalert, P., Kamatani, N., Nakamura, Y., Tokunaga, K., 2012. Genome-wide association studies of tuberculosis in Asians identify distinct at-risk locus for young tuberculosis. *J. Hum. Genet.* 57, 363–367. <https://doi.org/10.1038/jhg.2012.35>
- Majlessi, L., Brosch, R., 2015. Mycobacterium tuberculosis Meets the Cytosol: The Role of cGAS in Anti-mycobacterial Immunity. *Cell Host Microbe* 17, 733–735. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.05.017>
- Makishima, M., Okamoto, A.Y., Repa, J.J., Tu, H., Learned, R.M., Luk, A., Hull, M.V., Lustig, K.D., Mangelsdorf, D.J., Shan, B., 1999. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 284, 1362–1365.
- Malik, Z.A., Denning, G.M., Kusner, D.J., 2000. Inhibition of Ca(2+) signaling by Mycobacterium tuberculosis is associated with reduced phagosome-lysosome fusion and increased survival within human macrophages. *J. Exp. Med.* 191, 287–302.
- Malik, Z.A., Iyer, S.S., Kusner, D.J., 2001. Mycobacterium tuberculosis phagosomes exhibit altered calmodulin-dependent signal transduction: contribution to inhibition of phagosome-lysosome fusion and intracellular survival in human macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md* 166, 3392–3401.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., Evans, R.M., 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835–839.
- Männel, D.N., Echtenacher, B., 2000. TNF in the Inflammatory Response. *CD14 Inflamm. Response* 74, 141–161. <https://doi.org/10.1159/000058757>

- Mast, N., Graham, S.E., Andersson, U., Bjorkhem, I., Hill, C., Peterson, J., Pikuleva, I.A., 2005. Cholesterol binding to cytochrome P450 7A1, a key enzyme in bile acid biosynthesis. *Biochemistry* 44, 3259–3271. <https://doi.org/10.1021/bi047566a>
- McKinney, J.D., Höner zu Bentrup, K., Muñoz-Elías, E.J., Miczak, A., Chen, B., Chan, W.T., Swenson, D., Sacchettini, J.C., Jacobs, W.R., Russell, D.G., 2000. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* 406, 735–738. <https://doi.org/10.1038/35021074>
- McLaren, D.S., Frigg, M., 2000. SIGHT AND LIFE MANUAL ON VITAMIN A DEFICIENCY DISORDERS (VADD). *Community Eye Health* 13, 28.
- Melamed, A., Robinson, J.N., 2019. Case-control studies can be useful but have many limitations: Study design: case-control studies. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* 126, 23. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.15200>
- Méndez-Samperio, P., 2008. Role of antimicrobial peptides in host defense against mycobacterial infections. *Peptides* 29, 1836–1841. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.05.024>
- Miao, J., Fang, S., Bae, Y., Kemper, J.K., 2006. Functional inhibitory cross-talk between constitutive androstane receptor and hepatic nuclear factor-4 in hepatic lipid/glucose metabolism is mediated by competition for binding to the DR1 motif and to the common coactivators, GRIP-1 and PGC-1 α . *J. Biol. Chem.* 281, 14537–14546. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510713200>
- Micheau, O., Tschopp, J., 2003. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114, 181–190.
- Miller, B.H., Fratti, R.A., Poschet, J.F., Timmins, G.S., Master, S.S., Burgos, M., Marletta, M.A., Deretic, V., 2004. *Mycobacteria* inhibit nitric oxide synthase recruitment to phagosomes during macrophage infection. *Infect. Immun.* 72, 2872–2878.
- Miller, J.L., Velmurugan, K., Cowan, M.J., Briken, V., 2010. The type I NADH dehydrogenase of *Mycobacterium tuberculosis* counters phagosomal NOX2 activity to inhibit TNF- α -mediated host cell apoptosis. *PLoS Pathog.* 6, e1000864. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000864>
- Miner, M.D., Chang, J.C., Pandey, A.K., Sassetti, C.M., Sherman, D.R., 2009. Role of cholesterol in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Indian J. Exp. Biol.* 47, 407–411.
- Mitra, A.K., Alvarez, J.O., Stephensen, C.B., 1998a. Increased urinary retinol loss in children with severe infections. *Lancet Lond. Engl.* 351, 1033–1034. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)79000-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)79000-0)
- Mitra, A.K., Alvarez, J.O., Wahed, M.A., Fuchs, G.J., Stephensen, C.B., 1998b. Predictors of serum retinol in children with shigellosis. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 1088–1094.
- Mitro, N., Godio, C., De Fabiani, E., Scotti, E., Galmozzi, A., Gilardi, F., Caruso, D., Vigil Chacon, A.B., Crestani, M., 2007. Insights in the regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase gene reveal a target for modulating bile acid synthesis. *Hepatology* 46, 885–897. <https://doi.org/10.1002/hep.21819>
- Miyake, J.H., Wang, S.L., Davis, R.A., 2000. Bile acid induction of cytokine expression by macrophages correlates with repression of hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 275, 21805–21808. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000275200>
- Möller, M., de Wit, E., Hoal, E.G., 2010. Past, present and future directions in human genetic susceptibility to tuberculosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 58, 3–26. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2009.00600.x>
- Molowa, D.T., Chen, W.S., Cimisi, G.M., Tan, C.P., 1992. Transcriptional regulation of the human cholesterol 7 α -hydroxylase gene. *Biochemistry* 31, 2539–2544. <https://doi.org/10.1021/bi00124a014>
- Montfort, A., de Badts, B., Douin-Echinard, V., Martin, P.G.P., Iacovoni, J., Nevoit, C., Therville, N., Garcia, V., Bertrand, M.-A., Bessi eres, M.-H., Trombe, M.-C., Levade, T., Benoist, H., S egui, B., 2009. FAN stimulates TNF(α)-induced gene expression, leukocyte

- recruitment, and humoral response. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 183, 5369–5378. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803384>
- Montfort, A., Martin, P.G.P., Levade, T., Benoist, H., Ségui, B., 2010a. FAN (factor associated with neutral sphingomyelinase activation), a moonlighting protein in TNF-R1 signaling. *J. Leukoc. Biol.* 88, 897–903. <https://doi.org/10.1189/jlb.0410188>
- Montfort, A., Martin, P.G.P., Levade, T., Benoist, H., Ségui, B., 2010b. FAN (factor associated with neutral sphingomyelinase activation), a moonlighting protein in TNF-R1 signaling. *J. Leukoc. Biol.* 88, 897–903. <https://doi.org/10.1189/jlb.0410188>
- Moody, D.B., Young, D.C., Cheng, T.-Y., Rosat, J.-P., Roura-Mir, C., O'Connor, P.B., Zajonc, D.M., Walz, A., Miller, M.J., Levery, S.B., Wilson, I.A., Costello, C.E., Brenner, M.B., 2004. T cell activation by lipopeptide antigens. *Science* 303, 527–531. <https://doi.org/10.1126/science.1089353>
- Moulton, V.R., 2018. Sex Hormones in Acquired Immunity and Autoimmune Disease. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02279>
- Myant, N.B., Mitropoulos, K.A., 1977. Cholesterol 7 alpha-hydroxylase. *J. Lipid Res.* 18, 135–153.
- Myung, S.J., Yoon, J.-H., Gwak, G.-Y., Kim, W., Yang, J.I., Lee, S.H., Jang, J.J., Lee, H.-S., 2007. Bile acid-mediated thrombospondin-1 induction in hepatocytes leads to transforming growth factor-beta-dependent hepatic stellate cell activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353, 1091–1096. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.12.157>
- Nakamoto, K., Wang, S., Jenison, R.D., Guo, G.L., Klaassen, C.D., Wan, Y.-J.Y., Zhong, X., 2006. Linkage disequilibrium blocks, haplotype structure, and htSNPs of human CYP7A1 gene. *BMC Genet.* 7, 29. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-7-29>
- Nashold, F.E., Spach, K.M., Spanier, J.A., Hayes, C.E., 2009. Estrogen Controls Vitamin D3-Mediated Resistance to Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Controlling Vitamin D3 Metabolism and Receptor Expression. *J. Immunol.* 183, 3672–3681. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901351>
- Neumeyer, J., Hallas, C., Merkel, O., Winoto-Morbach, S., Jakob, M., Thon, L., Adam, D., Schneider-Brachert, W., Schütze, S., 2006. TNF-receptor I defective in internalization allows for cell death through activation of neutral sphingomyelinase. *Exp. Cell Res.* 312, 2142–2153. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.03.014>
- Neyrolles, O., Mintz, E., Catty, P., 2013. Zinc and copper toxicity in host defense against pathogens: *Mycobacterium tuberculosis* as a model example of an emerging paradigm. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00089>
- Neyrolles, O., Quintana-Murci, L., 2009. Sexual Inequality in Tuberculosis. *PLoS Med.* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000199>
- Neyrolles, O., Wolschendorf, F., Mitra, A., Niederweis, M., 2015. *Mycobacteria*, metals, and the macrophage. *Immunol. Rev.* 264, 249–263. <https://doi.org/10.1111/imr.12265>
- Nguyen, L., Pieters, J., 2005. The Trojan horse: survival tactics of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Trends Cell Biol.* 15, 269–276. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.03.009>
- Nhamoyebonde, S., Leslie, A., 2014. Biological differences between the sexes and susceptibility to tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 209 Suppl 3, S100–106. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu147>
- Noshiro, M., Okuda, K., 1990a. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding human cholesterol 7 alpha-hydroxylase. *FEBS Lett.* 268, 137–140.
- Noshiro, M., Okuda, K., 1990b. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding human cholesterol 7 alpha-hydroxylase. *FEBS Lett.* 268, 137–140.
- O'Brien, N.W., Gellings, N.M., Guo, M., Barlow, S.B., Glembofski, C.C., Sabbadini, R.A., 2003. Factor associated with neutral sphingomyelinase activation and its role in cardiac cell death. *Circ. Res.* 92, 589–591. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000066290.29715.67>
- Oddo, M., Renno, T., Attinger, A., Bakker, T., MacDonald, H.R., Meylan, P.R., 1998. Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 160, 5448–5454.

- Oh, J., Choi, R., Park, H.-D., Lee, H., Jeong, B.-H., Park, H.Y., Jeon, K., Kwon, O.J., Koh, W.-J., Lee, S.-Y., 2017. Evaluation of vitamin status in patients with pulmonary tuberculosis. *J. Infect.* 74, 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2016.10.009>
- Okamoto Yoshida, Y., Umemura, M., Yahagi, A., O'Brien, R.L., Ikuta, K., Kishihara, K., Hara, H., Nakae, S., Iwakura, Y., Matsuzaki, G., 2010. Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 4414–4422. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903332>
- Olakanmi, O., Schlesinger, L.S., Ahmed, A., Britigan, B.E., 2004. The nature of extracellular iron influences iron acquisition by *Mycobacterium tuberculosis* residing within human macrophages. *Infect. Immun.* 72, 2022–2028. <https://doi.org/10.1128/iai.72.4.2022-2028.2004>
- Omura, T., Sato, R., 1964. THE CARBON MONOXIDE-BINDING PIGMENT OF LIVER MICROSOMES. I. EVIDENCE FOR ITS HEMOPROTEIN NATURE. *J. Biol. Chem.* 239, 2370–2378.
- Omura, T., Sato, R., 1962. A new cytochrome in liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 237, 1375–1376.
- Pakasi, T.A., Karyadi, E., Wibowo, Y., Simanjuntak, Y., Suratih, N.M.D., Salean, M., Darmawidjaja, N., van der Meer, J.W.M., van der Velden, K., Dolmans, W.M.V., 2009. Vitamin A deficiency and other factors associated with severe tuberculosis in Timor and Rote Islands, East Nusa Tenggara Province, Indonesia. *Eur. J. Clin. Nutr.* 63, 1130–1135. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2009.25>
- Pandey, A.K., Sasseti, C.M., 2008. Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 4376–4380. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711159105>
- Park, H.-D., Guinn, K.M., Harrell, M.I., Liao, R., Voskuil, M.I., Tompa, M., Schoolnik, G.K., Sherman, D.R., 2003. Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 48, 833–843.
- Park, W.-H., Pak, Y.K., 2011. Insulin-dependent suppression of cholesterol 7 α -hydroxylase is a possible link between glucose and cholesterol metabolisms. *Exp. Mol. Med.* 43, 571–579. <https://doi.org/10.3858/emm.2011.43.10.064>
- Peppelenbosch, M., Boone, E., Jones, G.E., van Deventer, S.J., Haegeman, G., Fiers, W., Grooten, J., Ridley, A.J., 1999a. Multiple signal transduction pathways regulate TNF-induced actin reorganization in macrophages: inhibition of Cdc42-mediated filopodium formation by TNF. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 162, 837–845.
- Peppelenbosch, M., Boone, E., Jones, G.E., van Deventer, S.J., Haegeman, G., Fiers, W., Grooten, J., Ridley, A.J., 1999b. Multiple signal transduction pathways regulate TNF-induced actin reorganization in macrophages: inhibition of Cdc42-mediated filopodium formation by TNF. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 162, 837–845.
- Pérez-Guzmán, C., Vargas, M.H., 2006. Hypcholesterolemia: a major risk factor for developing pulmonary tuberculosis? *Med. Hypotheses* 66, 1227–1230. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2005.12.041>
- Pérez-Guzmán, C., Vargas, M.H., Quiñonez, F., Bazavilvazo, N., Aguilar, A., 2005. A cholesterol-rich diet accelerates bacteriologic sterilization in pulmonary tuberculosis. *Chest* 127, 643–651. <https://doi.org/10.1378/chest.127.2.643>
- Philipp, S., Puchert, M., Adam-Klages, S., Tchikov, V., Winoto-Morbach, S., Mathieu, S., Deerberg, A., Kolker, L., Marchesini, N., Kabelitz, D., Hannun, Y.A., Schütze, S., Adam, D., 2010. The Polycomb group protein EED couples TNF receptor 1 to neutral sphingomyelinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 1112–1117. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908486107>
- Picard, C., Fieschi, C., Altare, F., Al-Jumaah, S., Al-Hajjar, S., Feinberg, J., Dupuis, S., Soudais, C., Al-Mohsen, I.Z., Génin, E., Lammas, D., Kumararatne, D.S., Leclerc, T., Raffi, A., Frayha, H., Murugasu, B., Wah, L.B., Sinniah, R., Loubser, M., Okamoto, E., Al-Ghonaïm, A., Tufenkeji, H., Abel, L., Casanova, J.-L., 2002. Inherited interleukin-12 deficiency: IL12B

- genotype and clinical phenotype of 13 patients from six kindreds. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 336–348. <https://doi.org/10.1086/338625>
- Pieters, J., 2008. Mycobacterium tuberculosis and the Macrophage: Maintaining a Balance. *Cell Host Microbe* 3, 399–407. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.05.006>
- Pinzan, C.F., Ruas, L.P., Casabona-Fortunato, A.S., Carvalho, F.C., Roque-Barreira, M.-C., 2010. Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *PloS One* 5, e10757. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010757>
- Ponugoti, B., Fang, S., Kemper, J.K., 2007. Functional interaction of hepatic nuclear factor-4 and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha in CYP7A1 regulation is inhibited by a key lipogenic activator, sterol regulatory element-binding protein-1c. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 21, 2698–2712. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0196>
- Porter, T.D., Coon, M.J., 1991. Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *J. Biol. Chem.* 266, 13469–13472.
- Pullinger, C.R., Eng, C., Salen, G., Shefer, S., Batta, A.K., Erickson, S.K., Verhagen, A., Rivera, C.R., Mulvihill, S.J., Malloy, M.J., Kane, J.P., 2002. Human cholesterol 7alpha-hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype. *J. Clin. Invest.* 110, 109–117. <https://doi.org/10.1172/JCI15387>
- Qi, Y., Jiang, C., Cheng, J., Krausz, K.W., Li, T., Ferrell, J.M., Gonzalez, F.J., Chiang, J.Y.L., 2015. Bile acid signaling in lipid metabolism: metabolomic and lipidomic analysis of lipid and bile acid markers linked to anti-obesity and anti-diabetes in mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1851, 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2014.04.008>
- Qraflı, M., Amar, Y., Bourkadi, J., Ben Amor, J., Iraki, G., Bakri, Y., Amzazi, S., Lahlou, O., Seghrouchni, F., El Aouad, R., Sadki, K., 2014. The CYP7A1 gene rs3808607 variant is associated with susceptibility of tuberculosis in Moroccan population. *Pan Afr. Med. J.* 18, 1. <https://doi.org/10.11604/pamj.2014.18.1.3397>
- Qraflı, M., Asekkaj, I., Bourkadi, J.E., El Aouad, R., Sadki, K., 2017. New variant identified in major susceptibility locus to tuberculosis on chromosomal region 8q12-q13 in Moroccan population: a case control study. *BMC Infect. Dis.* 17, 712. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2807-9>
- Quadro, L., Blaner, W.S., Salchow, D.J., Vogel, S., Piantadosi, R., Gouras, P., Freeman, S., Cosma, M.P., Colantuoni, V., Gottesman, M.E., 1999. Impaired retinal function and vitamin A availability in mice lacking retinol-binding protein. *EMBO J.* 18, 4633–4644. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.17.4633>
- Queval, C.J., Brosch, R., Simeone, R., 2017. The Macrophage: A Disputed Fortress in the Battle against Mycobacterium tuberculosis. *Front. Microbiol.* 8, 2284. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02284>
- Ramachandran, G., Santha, T., Garg, R., Baskaran, D., Iliayas, S.A., Venkatesan, P., Fathima, R., Narayanan, P.R., 2004. Vitamin A levels in sputum-positive pulmonary tuberculosis patients in comparison with household contacts and healthy “normals.” *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* 8, 1130–1133.
- Ramakrishnan, L., 2012. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 352–366. <https://doi.org/10.1038/nri3211>
- Raverdeau, M., Mills, K.H.G., 2014. Modulation of T cell and innate immune responses by retinoic Acid. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 192, 2953–2958. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303245>
- Reed, J.R., Backes, W.L., 2017. Physical Studies of P450–P450 Interactions: Predicting Quaternary Structures of P450 Complexes in Membranes from Their X-ray Crystal Structures. *Front. Pharmacol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00028>
- Rezk, M., Marawan, H., Dawood, R., Masood, A., Abo-Elnasr, M., 2015. Prevalence and risk factors of iron-deficiency anaemia among pregnant women in rural districts of Menoufia

- governorate, Egypt. *J. Obstet. Gynaecol. J. Inst. Obstet. Gynaecol.* 35, 663–666. <https://doi.org/10.3109/01443615.2014.991289>
- Roach, S.K., Schorey, J.S., 2002. Differential regulation of the mitogen-activated protein kinases by pathogenic and nonpathogenic mycobacteria. *Infect. Immun.* 70, 3040–3052. <https://doi.org/10.1128/iai.70.6.3040-3052.2002>
- Rockett, K.A., Brookes, R., Udalova, I., Vidal, V., Hill, A.V., Kwiatkowski, D., 1998. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ induces nitric oxide synthase and suppresses growth of *Mycobacterium tuberculosis* in a human macrophage-like cell line. *Infect. Immun.* 66, 5314–5321.
- Rodriguez, G.M., Smith, I., 2006. Identification of an ABC transporter required for iron acquisition and virulence in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 188, 424–430. <https://doi.org/10.1128/JB.188.2.424-430.2006>
- Rohde, K., Yates, R.M., Purdy, G.E., Russell, D.G., 2007. *Mycobacterium tuberculosis* and the environment within the phagosome. *Immunol. Rev.* 219, 37–54. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00547.x>
- Rojas, M., Olivier, M., García, L.F., 2002. Activation of JAK2/STAT1- α -dependent signaling events during *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage apoptosis. *Cell. Immunol.* 217, 58–66. [https://doi.org/10.1016/s0008-8749\(02\)00515-4](https://doi.org/10.1016/s0008-8749(02)00515-4)
- Russell, D.G., 2007. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 39–47. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1538>
- Ryan, B.M., Robles, A.I., Harris, C.C., 2010. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nat. Rev. Cancer* 10, 389–402. <https://doi.org/10.1038/nrc2867>
- Ryndak, M.B., Wang, S., Smith, I., Rodriguez, G.M., 2010. The *Mycobacterium tuberculosis* high-affinity iron importer, IrtA, contains an FAD-binding domain. *J. Bacteriol.* 192, 861–869. <https://doi.org/10.1128/JB.00223-09>
- Saeed, A., Hoekstra, M., Hoeke, M.O., Heegsma, J., Faber, K.N., 2017. The interrelationship between bile acid and vitamin A homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1862, 496–512. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.01.007>
- Sakowski, E.T., Koster, S., Portal Celhay, C., Park, H.S., Shrestha, E., Hetzenecker, S.E., Maurer, K., Cadwell, K., Philips, J.A., 2015. Ubiquitin 1 Promotes IFN- γ -Induced Xenophagy of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 11, e1005076. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005076>
- Sánchez, A., Espinosa, P., García, T., Mancilla, R., 2012. The 19 kDa *Mycobacterium tuberculosis* lipoprotein (LpqH) induces macrophage apoptosis through extrinsic and intrinsic pathways: a role for the mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 950503. <https://doi.org/10.1155/2012/950503>
- Sánchez, C., Rueda, D., Ségui, B., Galve-Roperh, I., Levade, T., Guzmán, M., 2001. The CB(1) cannabinoid receptor of astrocytes is coupled to sphingomyelin hydrolysis through the adaptor protein $\text{f}\alpha$. *Mol. Pharmacol.* 59, 955–959.
- Schaible, U.E., Winau, F., Sieling, P.A., Fischer, K., Collins, H.L., Hagens, K., Modlin, R.L., Brinkmann, V., Kaufmann, S.H.E., 2003. Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nat. Med.* 9, 1039–1046. <https://doi.org/10.1038/nm906>
- Schatz, A., Bugle, E., Waksman, S.A., 1944. Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria.*†. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 55, 66–69. <https://doi.org/10.3181/00379727-55-14461>
- Schmidt, D.R., Holmstrom, S.R., Fon Tacer, K., Bookout, A.L., Kliwer, S.A., Mangelsdorf, D.J., 2010. Regulation of bile acid synthesis by fat-soluble vitamins A and D. *J. Biol. Chem.* 285, 14486–14494. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.116004>

- Schneider-Brachert, W., Tchikov, V., Neumeyer, J., Jakob, M., Winoto-Morbach, S., Held-Feindt, J., Heinrich, M., Merkel, O., Ehrenschröder, M., Adam, D., Mentlein, R., Kabelitz, D., Schütze, S., 2004. Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptosomes as death signaling vesicles. *Immunity* 21, 415–428. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.08.017>
- Schurz, H., Daya, M., Möller, M., Hoal, E.G., Salie, M., 2015. TLR1, 2, 4, 6 and 9 Variants Associated with Tuberculosis Susceptibility: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS One* 10, e0139711. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139711>
- Schurz, H., Salie, M., Tromp, G., Hoal, E.G., Kinnear, C.J., Möller, M., 2019. The X chromosome and sex-specific effects in infectious disease susceptibility. *Hum. Genomics* 13. <https://doi.org/10.1186/s40246-018-0185-z>
- Schwarz, M., Lund, E.G., Russell, D.W., 1998. Two 7 alpha-hydroxylase enzymes in bile acid biosynthesis. *Curr. Opin. Lipidol.* 9, 113–118.
- Segueni, N., Tritto, E., Bourigault, M.-L., Rose, S., Erard, F., Le Bert, M., Jacobs, M., Di Padova, F., Stiehl, D.P., Moulin, P., Brees, D., Chibout, S.-D., Ryffel, B., Kammüller, M., Quesniaux, V.F., 2016. Controlled Mycobacterium tuberculosis infection in mice under treatment with anti-IL-17A or IL-17F antibodies, in contrast to TNF α neutralization. *Sci. Rep.* 6, 36923. <https://doi.org/10.1038/srep36923>
- Ségui, B., Andrieu-Abadie, N., Adam-Klages, S., Meilhac, O., Kreder, D., Garcia, V., Bruno, A.P., Jaffrézou, J.P., Salvayre, R., Krönke, M., Levade, T., 1999. CD40 signals apoptosis through FAN-regulated activation of the sphingomyelin-ceramide pathway. *J. Biol. Chem.* 274, 37251–37258.
- Ségui, B., Cuvillier, O., Adam-Klages, S., Garcia, V., Malagarie-Cazenave, S., Lévêque, S., Caspar-Bauguil, S., Coudert, J., Salvayre, R., Krönke, M., Levade, T., 2001. Involvement of FAN in TNF-induced apoptosis. *J. Clin. Invest.* 108, 143–151. <https://doi.org/10.1172/JCI11498>
- Ségui, Bruno, Cuvillier, O., Levade, T., Adam-Klages, S., Krönke, M., 2001. Un rôle pour la protéine FAN (factor associated with neutral sphingomyelinase activation) dans la signalisation de l'apoptose. *médecine/sciences* 17, 1210–1213. <https://doi.org/10.1051/medsci/200117111210>
- Serbina, N.V., Lazarevic, V., Flynn, J.L., 2001. CD4(+) T cells are required for the development of cytotoxic CD8(+) T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. *J. Immunol. Baltim. Md* 167, 6991–7000.
- Seto, S., Tsujimura, K., Horii, T., Koide, Y., 2013. Autophagy adaptor protein p62/SQSTM1 and autophagy-related gene Atg5 mediate autophagosome formation in response to Mycobacterium tuberculosis infection in dendritic cells. *PloS One* 8, e86017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086017>
- Shakersain, B., Santoni, G., Faxén-Irving, G., Rizzuto, D., Fratiglioni, L., Xu, W., 2016. Nutritional status and survival among old adults: an 11-year population-based longitudinal study. *Eur. J. Clin. Nutr.* <https://doi.org/10.1038/ejcn.2015.109>
- Shen, H., Chen, Z.W., 2018. The crucial roles of Th17-related cytokines/signal pathways in M. tuberculosis infection. *Cell. Mol. Immunol.* 15, 216–225. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.128>
- Shin, D.-J., Campos, J.A., Gil, G., Osborne, T.F., 2003. PGC-1 α activates CYP7A1 and bile acid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 278, 50047–50052. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309736200>
- Silva, D.R., Muñoz-Torrico, M., Duarte, R., Galvão, T., Bonini, E.H., Arbex, F.F., Arbex, M.A., Augusto, V.M., Rabahi, M.F., Mello, F.C. de Q., 2018. Risk factors for tuberculosis: diabetes, smoking, alcohol use, and the use of other drugs. *J. Bras. Pneumol. Publicacao Of. Soc. Bras. Pneumol. E Tisiologia* 44, 145–152. <https://doi.org/10.1590/s1806-37562017000000443>

- Simeone, R., Bobard, A., Lippmann, J., Bitter, W., Majlessi, L., Brosch, R., Enninga, J., 2012. Phagosomal rupture by *Mycobacterium tuberculosis* results in toxicity and host cell death. *PLoS Pathog.* 8, e1002507. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002507>
- Skeeles, L.E., Fleming, J.L., Mahler, K.L., Toland, A.E., 2013. The Impact of 3'UTR Variants on Differential Expression of Candidate Cancer Susceptibility Genes. *PloS One* 8, e58609. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058609>
- Sly, L.M., Hingley-Wilson, S.M., Reiner, N.E., McMaster, W.R., 2003. Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in host macrophages involves resistance to apoptosis dependent upon induction of antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 170, 430–437.
- Smith, A.T., Pazicni, S., Marvin, K.A., Stevens, D.J., Paulsen, K.M., Burstyn, J.N., 2015. Functional divergence of heme-thiolate proteins: a classification based on spectroscopic attributes. *Chem. Rev.* 115, 2532–2558. <https://doi.org/10.1021/cr500056m>
- Sommer, A., West, K.P., Olson, J.A., Ross, A.C., 1996. Vitamin A Deficiency: Health, Survival and Vision. *Oxf. Univ. Press N. Y. N.*
- Song, K.-H., Chiang, J.Y.L., 2006. Glucagon and cAMP inhibit cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) gene expression in human hepatocytes: discordant regulation of bile acid synthesis and gluconeogenesis. *Hepatol. Baltim. Md* 43, 117–125. <https://doi.org/10.1002/hep.20919>
- Soto-Ramirez, M.D., Aguilar-Ayala, D.A., Garcia-Morales, L., Rodriguez-Peredo, S.M., Badillo-Lopez, C., Rios-Muñiz, D.E., Meza-Segura, M.A., Rivera-Morales, G.Y., Leon-Solis, L., Cerna-Cortes, J.F., Rivera-Gutierrez, S., Helguera-Repetto, A.C., Gonzalez-Y-Merchand, J.A., 2017. Cholesterol plays a larger role during *Mycobacterium tuberculosis* in vitro dormancy and reactivation than previously suspected. *Tuberc. Edinb. Scotl.* 103, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2016.12.004>
- Srinivasan, L., Ahlbrand, S., Briken, V., 2014a. Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with Host Cell Death Pathways. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 4. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022459>
- Srinivasan, L., Ahlbrand, S., Briken, V., 2014b. Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with Host Cell Death Pathways. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 4. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022459>
- Srivastava, A., Choudhuri, G., Mittal, B., 2010. CYP7A1 (-204 A>C; rs3808607 and -469 T>C; rs3824260) promoter polymorphisms and risk of gallbladder cancer in North Indian population. *Metabolism.* 59, 767–773. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2009.09.021>
- Srivastava, A., Pandey, S.N., Choudhuri, G., Mittal, B., 2008. Role of genetic variant A-204C of cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) in susceptibility to gallbladder cancer. *Mol. Genet. Metab.* 94, 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2007.11.014>
- Stanley, S.A., Raghavan, S., Hwang, W.W., Cox, J.S., 2003. Acute infection and macrophage subversion by *Mycobacterium tuberculosis* require a specialized secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 13001–13006. <https://doi.org/10.1073/pnas.2235593100>
- Stead, W.W., Senner, J.W., Reddick, W.T., Lofgren, J.P., 1990a. Racial differences in susceptibility to infection by *Mycobacterium tuberculosis*. *N. Engl. J. Med.* 322, 422–427. <https://doi.org/10.1056/NEJM199002153220702>
- Stead, W.W., Senner, J.W., Reddick, W.T., Lofgren, J.P., 1990b. Racial differences in susceptibility to infection by *Mycobacterium tuberculosis*. *N. Engl. J. Med.* 322, 422–427. <https://doi.org/10.1056/NEJM199002153220702>
- Stephensen, C.B., Alvarez, J.O., Kohatsu, J., Hardmeier, R., Kennedy, J.I., Gammon, R.B., 1994. Vitamin A is excreted in the urine during acute infection. *Am. J. Clin. Nutr.* 60, 388–392.
- Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P.H., Chakraborty, P., Haddix, P.L., Collins, H.L., Fok, A.K., Allen, R.D., Gluck, S.L., Heuser, J., Russell, D.G., 1994. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 263, 678–681.

- Sveinbjornsson, G., Gudbjartsson, D.F., Halldorsson, B.V., Kristinsson, K.G., Gottfredsson, M., Barrett, J.C., Gudmundsson, L.J., Blondal, K., Gylfason, A., Gudjonsson, S.A., Helgadóttir, H.T., Jonasdóttir, Adalbjorg, Jonasdóttir, Aslaug, Karason, A., Kardum, L.B., Knežević, J., Kristjansson, H., Kristjansson, M., Love, A., Luo, Y., Magnusson, O.T., Sulem, P., Kong, A., Masson, G., Thorsteinsdóttir, U., Dembic, Z., Nejentsev, S., Blondal, T., Jonsdóttir, I., Stefansson, K., 2016. HLA class II sequence variants influence tuberculosis risk in populations of European ancestry. *Nat. Genet.* 48, 318–322. <https://doi.org/10.1038/ng.3498>
- Sztanke, M., Pasternak, K., Borzecki, A., 2004. The influence of sex hormones and vitamin E on ascorbic acid concentration in rat tissues. *Ann. Univ. Mariae Curie Skłodowska [Med.]* 59, 134–139.
- Tabata, S., Yin, G., Ogawa, S., Yamaguchi, K., Mineshita, M., Kono, S., 2006. Genetic polymorphism of cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) and colorectal adenomas: Self Defense Forces Health Study. *Cancer Sci.* 97, 406–410. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2006.00182.x>
- Tall, A.R., Yvan-Charvet, L., 2015. Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 104–116. <https://doi.org/10.1038/nri3793>
- Taneja, V., 2018. Sex Hormones Determine Immune Response. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01931>
- Tanumihardjo, S.A., 2011. Vitamin A: biomarkers of nutrition for development. *Am. J. Clin. Nutr.* 94, 658S–665S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.005777>
- Tempel, W., Grabovec, I., MacKenzie, F., Dichenko, Y.V., Usanov, S.A., Gilep, A.A., Park, H.-W., Strushkevich, N., 2014. Structural characterization of human cholesterol 7 α -hydroxylase. *J. Lipid Res.* 55, 1925–1932. <https://doi.org/10.1194/jlr.M050765>
- Testa, B., Krämer, S.D., 2007. The Biochemistry of Drug Metabolism – An Introduction. *Chem. Biodivers.* 4, 257–405. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200790032>
- Thye, T., Owusu-Dabo, E., Vannberg, F.O., van Crevel, R., Curtis, J., Sahiratmadja, E., Balabanova, Y., Ehmen, C., Muntau, B., Ruge, G., Sievertsen, J., Gyapong, J., Nikolayevskyy, V., Hill, P.C., Sirugo, G., Drobniewski, F., van de Vosse, E., Newport, M., Alisjahbana, B., Nejentsev, S., Ottenhoff, T.H.M., Hill, A.V.S., Horstmann, R.D., Meyer, C.G., 2012. Common variants at 11p13 are associated with susceptibility to tuberculosis. *Nat. Genet.* 44, 257–259. <https://doi.org/10.1038/ng.1080>
- Thye, T., Vannberg, F.O., Wong, S.H., Owusu-Dabo, E., Osei, I., Gyapong, J., Sirugo, G., Sisay-Joof, F., Enimil, A., Chinbuah, M.A., Floyd, S., Warndorff, D.K., Sichali, L., Malema, S., Crampin, A.C., Ngwira, B., Teo, Y.Y., Small, K., Rockett, K., Kwiatkowski, D., Fine, P.E., Hill, P.C., Newport, M., Lienhardt, C., Adegbola, R.A., Corrah, T., Ziegler, A., African TB Genetics Consortium, Wellcome Trust Case Control Consortium, Morris, A.P., Meyer, C.G., Horstmann, R.D., Hill, A.V.S., 2010. Genome-wide association analyses identifies a susceptibility locus for tuberculosis on chromosome 18q11.2. *Nat. Genet.* 42, 739–741. <https://doi.org/10.1038/ng.639>
- Trauner, A., Loughheed, K.E.A., Bennett, M.H., Hingley-Wilson, S.M., Williams, H.D., 2012. The Dormancy Regulator DosR Controls Ribosome Stability in Hypoxic Mycobacteria. *J. Biol. Chem.* 287, 24053–24063. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.364851>
- Tu, H., Okamoto, A.Y., Shan, B., 2000. FXR, a bile acid receptor and biological sensor. *Trends Cardiovasc. Med.* 10, 30–35.
- Twisk, J., Hoekman, M.F., Lehmann, E.M., Meijer, P., Mager, W.H., Princen, H.M., 1995. Insulin suppresses bile acid synthesis in cultured rat hepatocytes by down-regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase and sterol 27-hydroxylase gene transcription. *Hepatology* 21, 501–510.
- Upadhyay, S., Mittal, E., Philips, J.A., 2018. Tuberculosis and the art of macrophage manipulation. *Pathog. Dis.* 76. <https://doi.org/10.1093/femspd/fty037>

- van der Wel, N., Hava, D., Houben, D., Fluitsma, D., van Zon, M., Pierson, J., Brenner, M., Peters, P.J., 2007. M. tuberculosis and M. leprae translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell* 129, 1287–1298. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.059>
- van Lettow, M., Harries, A.D., Kumwenda, J.J., Zijlstra, E.E., Clark, T.D., Taha, T.E., Semba, R.D., 2004. Micronutrient malnutrition and wasting in adults with pulmonary tuberculosis with and without HIV co-infection in Malawi. *BMC Infect. Dis.* 4, 61. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-4-61>
- Vergne, I., Chua, J., Lee, H.-H., Lucas, M., Belisle, J., Deretic, V., 2005. Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable Mycobacterium tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 4033–4038. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409716102>
- Via, L.E., Lin, P.L., Ray, S.M., Carrillo, J., Allen, S.S., Eum, S.Y., Taylor, K., Klein, E., Manjunatha, U., Gonzales, J., Lee, E.G., Park, S.K., Raleigh, J.A., Cho, S.N., McMurray, D.N., Flynn, J.L., Barry, C.E., 2008. Tuberculous Granulomas Are Hypoxic in Guinea Pigs, Rabbits, and Nonhuman Primates. *Infect. Immun.* 76, 2333–2340. <https://doi.org/10.1128/IAI.01515-07>
- Vieira, O.V., Botelho, R.J., Grinstein, S., 2002. Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem. J.* 366, 689–704. <https://doi.org/10.1042/BJ20020691>
- Villemin, J.-A., 1868. De la virulence et de la spécificité de la tuberculose.
- Virgin, H.W., Levine, B., 2009. Autophagy genes in immunity. *Nat. Immunol.* 10, 461–470. <https://doi.org/10.1038/ni.1726>
- Walburger, A., Koul, A., Ferrari, G., Nguyen, L., Prescianotto-Baschong, C., Huygen, K., Klebl, B., Thompson, C., Bacher, G., Pieters, J., 2004. Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science* 304, 1800–1804. <https://doi.org/10.1126/science.1099384>
- Walter, F., Ott, J.J., Claus, H., Krause, G., 2018. Sex- and age patterns in incidence of infectious diseases in Germany: analyses of surveillance records over a 13-year period (2001–2013). *Epidemiol. Infect.* 146, 372–378. <https://doi.org/10.1017/S0950268817002771>
- Wang, D., Hartmann, K., Seweryn, M., Sadee, W., 2018. Interactions Between Regulatory Variants in CYP7A1 (Cholesterol 7 α -Hydroxylase) Promoter and Enhancer Regions Regulate CYP7A1 Expression. *Circ. Genomic Precis. Med.* 11, e002082. <https://doi.org/10.1161/CIRCGEN.118.002082>
- Wang, J., Freeman, D.J., Grundy, S.M., Levine, D.M., Guerra, R., Cohen, J.C., 1998. Linkage between cholesterol 7 α -hydroxylase and high plasma low-density lipoprotein cholesterol concentrations. *J. Clin. Invest.* 101, 1283–1291. <https://doi.org/10.1172/JCI1343>
- Wang, J., Yang, K., Zhou, L., Minhaowu, null, Wu, Y., Zhu, M., Lai, X., Chen, T., Feng, L., Li, M., Huang, C., Zhong, Q., Huang, X., 2013. MicroRNA-155 promotes autophagy to eliminate intracellular mycobacteria by targeting Rheb. *PLoS Pathog.* 9, e1003697. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003697>
- Wang, Y.-D., Chen, W.-D., Moore, D.D., Huang, W., 2008. FXR: a metabolic regulator and cell protector. *Cell Res.* 18, 1087–1095. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.289>
- Wang, Y.-M., Zhou, P., Wang, L.-Y., Li, Z.-H., Zhang, Y.-N., Zhang, Y.-X., 2012. Correlation Between DNase I Hypersensitive Site Distribution and Gene Expression in HeLa S3 Cells. *PLoS ONE* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042414>
- Ward, S.K., Abomoelak, B., Hoye, E.A., Steinberg, H., Talaat, A.M., 2010. CtpV: a putative copper exporter required for full virulence of Mycobacterium tuberculosis. *Mol. Microbiol.* 77, 1096–1110. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07273.x>
- Watson, R.O., Bell, S.L., MacDuff, D.A., Kimmey, J.M., Diner, E.J., Olivas, J., Vance, R.E., Stallings, C.L., Virgin, H.W., Cox, J.S., 2015. The Cytosolic Sensor cGAS Detects Mycobacterium tuberculosis DNA to Induce Type I Interferons and Activate Autophagy. *Cell Host Microbe* 17, 811–819. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.05.004>

- Watson, R.O., Manzanillo, P.S., Cox, J.S., 2012. Extracellular *M. tuberculosis* DNA targets bacteria for autophagy by activating the host DNA-sensing pathway. *Cell* 150, 803–815. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.040>
- Weill-Hallé, B., Turpin, R., 1925. Premiers essais de vaccination antituberculeuse de l'enfant par le bacille Calmette-Guérin (BCG). *Bull Mem Soc Med Hop Paris*.
- Welin, A., Raffetseder, J., Eklund, D., Stendahl, O., Lerm, M., 2011. Importance of phagosomal functionality for growth restriction of *Mycobacterium tuberculosis* in primary human macrophages. *J. Innate Immun.* 3, 508–518. <https://doi.org/10.1159/000325297>
- Werneburg, N., Guicciardi, M.E., Yin, X.-M., Gores, G.J., 2004. TNF-alpha-mediated lysosomal permeabilization is FAN and caspase 8/Bid dependent. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287, G436–443. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00019.2004>
- Wertheim, B.C., Smith, J.W., Fang, C., Alberts, D.S., Lance, P., Thompson, P.A., 2012. Risk modification of colorectal adenoma by CYP7A1 polymorphisms and the role of bile acid metabolism in carcinogenesis. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* 5, 197–204. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0320>
- Wheelwright, M., Kim, E.W., Inkeles, M.S., De Leon, A., Pellegrini, M., Krutzik, S.R., Liu, P.T., 2014. All-trans retinoic acid-triggered antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* is dependent on NPC2. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 192, 2280–2290. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301686>
- WHO, 2019. Global tuberculosis report. Geneva: World Health Organization.
- WHO, 2018a. WHO | Global tuberculosis report 2018. WHO.
- WHO, 2018b. Global tuberculosis report 2018.
- WHO, 1996. WHO | Indicators for assessing vitamin A deficiency and their application in monitoring and evaluating intervention programmes [WWW Document]. WHO. URL http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/vitamin_a_deficiency/WHO_NUT_96.10/en/ (accessed 12.27.15).
- Wiid, I., Seaman, T., Hoal, E.G., Benade, A.J.S., Van Helden, P.D., 2004. Total antioxidant levels are low during active TB and rise with anti-tuberculosis therapy. *IUBMB Life* 56, 101–106. <https://doi.org/10.1080/15216540410001671259>
- Wilkinson, D.S., Ogden, S.K., Stratton, S.A., Piechan, J.L., Nguyen, T.T., Smulian, G.A., Barton, M.C., 2005. A direct intersection between p53 and transforming growth factor beta pathways targets chromatin modification and transcription repression of the alpha-fetoprotein gene. *Mol. Cell. Biol.* 25, 1200–1212. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.3.1200-1212.2005>
- Williams, P.A., Cosme, J., Sridhar, V., Johnson, E.F., McRee, D.E., 2000. Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Mol. Cell* 5, 121–131.
- Winau, F., Weber, S., Sad, S., de Diego, J., Hoops, S.L., Breiden, B., Sandhoff, K., Brinkmann, V., Kaufmann, S.H.E., Schaible, U.E., 2006. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity* 24, 105–117. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.12.001>
- Wolschendorf, F., Ackart, D., Shrestha, T.B., Hascall-Dove, L., Nolan, S., Lamichhane, G., Wang, Y., Bossmann, S.H., Basaraba, R.J., Niederweis, M., 2011. Copper resistance is essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 1621–1626. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009261108>
- Xiao, Y., Yan, W., Zhou, K., Cao, Y., Cai, W., 2016. Glucocorticoid treatment alters systemic bile acid homeostasis by regulating the biosynthesis and transport of bile salts. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* 48, 771–779. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2016.03.022>
- Xu, Y., Jagannath, C., Liu, X.-D., Sharafkhaneh, A., Kolodziejaska, K.E., Eissa, N.T., 2007. Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity* 27, 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.05.022>

- Yadav, R.J., 2006. Prevalence of vitamin A deficiency in Bihar: A gender perspective. *Indian J. Prevetive Med.*
- Yamada, H., Mizuno, S., Ross, A.C., Sugawara, I., 2007. Retinoic acid therapy attenuates the severity of tuberculosis while altering lymphocyte and macrophage numbers and cytokine expression in rats infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Nutr.* 137, 2696–2700.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., Akira, S., 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301, 640–643. <https://doi.org/10.1126/science.1087262>
- Yang, C.-S., Lee, J.-S., Song, C.-H., Hur, G.M., Lee, S.J., Tanaka, S., Akira, S., Paik, T.-H., Jo, E.-K., 2007. Protein kinase C zeta plays an essential role for *Mycobacterium tuberculosis*-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in monocytes/macrophages via Toll-like receptor 2. *Cell. Microbiol.* 9, 382–396. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00797.x>
- Yang, C.-S., Shin, D.-M., Kim, K.-H., Lee, Z.-W., Lee, C.-H., Park, S.G., Bae, Y.S., Jo, E.-K., 2009. NADPH oxidase 2 interaction with TLR2 is required for efficient innate immune responses to mycobacteria via cathelicidin expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 3696–3705. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802217>
- Yao, K., Chen, Q., Wu, Y., Liu, F., Chen, X., Zhang, Y., 2017. Unphosphorylated STAT1 represses apoptosis in macrophages during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Cell Sci* 130, 1740–1751. <https://doi.org/10.1242/jcs.200659>
- Yates, R.M., Hermetter, A., Russell, D.G., 2005. The kinetics of phagosome maturation as a function of phagosome/lysosome fusion and acquisition of hydrolytic activity. *Traffic Cph. Den.* 6, 413–420. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00284.x>
- Ye, Y., Li, X., Wang, W., Ouedraogo, K.C., Li, Y., Gan, C., Tan, S., Zhou, X., Wu, M., 2014. Atg7 deficiency impairs host defense against *Klebsiella pneumoniae* by impacting bacterial clearance, survival and inflammatory responses in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 307, L355–363. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00046.2014>
- Young, S.A., Mina, J.G., Denny, P.W., Smith, T.K., 2012. Sphingolipid and Ceramide Homeostasis: Potential Therapeutic Targets [WWW Document]. *Biochem. Res. Int.* <https://doi.org/10.1155/2012/248135>
- Zhai, W., Wu, F., Zhang, Y., Fu, Y., Liu, Z., 2019. The Immune Escape Mechanisms of *Mycobacterium Tuberculosis*. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20020340>
- Zhang, V., Nemeth, E., Kim, A., 2019. Iron in Lung Pathology. *Pharm. Basel Switz.* 12. <https://doi.org/10.3390/ph12010030>
- Zhang, Y., Yin, L., Anderson, J., Ma, H., Gonzalez, F.J., Willson, T.M., Edwards, P.A., 2010. Identification of novel pathways that control farnesoid X receptor-mediated hypocholesterolemia. *J. Biol. Chem.* 285, 3035–3043. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.083899>
- Zhu, X., Lee, J.-Y., Timmins, J.M., Brown, J.M., Boudyguina, E., Mulya, A., Gebre, A.K., Willingham, M.C., Hiltbold, E.M., Mishra, N., Maeda, N., Parks, J.S., 2008. Increased cellular free cholesterol in macrophage-specific Abca1 knock-out mice enhances pro-inflammatory response of macrophages. *J. Biol. Chem.* 283, 22930–22941. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801408200>
- Zhu, X., Westcott, M.M., Bi, X., Liu, M., Gowdy, K.M., Seo, J., Cao, Q., Gebre, A.K., Fessler, M.B., Hiltbold, E.M., Hiltbold, E.M., Parks, J.S., 2012. Myeloid cell-specific ABCA1 deletion protects mice from bacterial infection. *Circ. Res.* 111, 1398–1409. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.269043>
- Zuckerman, S.H., Bryan-Poole, N., Evans, G.F., Short, L., Glasebrook, A.L., 1995. In vivo modulation of murine serum tumour necrosis factor and interleukin-6 levels during endotoxemia by oestrogen agonists and antagonists. *Immunology* 86, 18–24.

CENTRES D'ETUDES DOCTORALES-SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Résumé

La tuberculose est une maladie multifactorielle causée par des interactions complexes entre le bacille, des facteurs spécifiques à l'hôte, tels que le patrimoine génétique, et des facteurs environnementaux, tels que les carences en micronutriments. Comprendre ces interactions est essentiel pour développer de nouvelles stratégies de traitement.

Ces travaux de thèse ont d'abord rapporté que le génotype AA de rs3808607 et le génotype CT de rs1050504 sont associés de manière significative à un risque accru de tuberculose pulmonaire (OR 1,94, IC 95% 1,03–3,65; $p = 0,02$; OR 1,95, IC 95% 1,16–3,27; $p = 0,01$ respectivement). Alors que le génotype TT de rs1050504 était associé à une protection contre la tuberculose pulmonaire (OR 0,23, IC 95% 0,08–0,63; $p = 0,002$).

En outre, l'analyse des haplotypes de ces deux polymorphismes a montré que lorsque les génotypes AA rs3808607 et CT rs1050504 étaient co-hérités, la vulnérabilité à la tuberculose était très importante (OR 13,5, IC 95% 1,72–105,9; $p = 0,0006$). Nos résultats suggèrent que les variations génétiques dans les gènes *NSMAF* et *CYP7A1* pourraient moduler le risque de développer la tuberculose pulmonaire dans la population marocaine.

D'autre part, nous avons aussi montré que les patients tuberculeux présentent de faibles concentrations de rétinol plasmatique par rapport aux témoins sains. Nos données ont également révélé une discrimination sexuelle dans la carence en vitamine A. Les concentrations du rétinol étaient plus basses chez les hommes tuberculeux par rapport à leurs homologues sains.

Mots-clés: tuberculose, Marocaine, *CYP7A1*, *NSMAF*, vitamine A.

Abstract

Tuberculosis is a multifactorial disease resulting from complex interactions between bacillus, host-specific factors like genetic background, and environmental factors such as micronutrients deficiency. Understanding these interactions is necessary to develop new therapeutic strategies.

Through this scientific work, we first showed that the AA genotype of rs3808607 and CT genotype of rs1050504 were significantly associated with an increased risk for developing pulmonary TB (OR 1,94, IC 95% 1,03–3,65; $p = 0,02$; OR 1,95, IC 95% 1,16–3,27; $p = 0,01$ respectively). While, the TT genotype of rs1050504 was associated with protection against pulmonary TB (OR 0,23, IC 95% 0,08–0,63; $p = 0,002$).

In addition, haplotype analysis of these two polymorphisms showed that when the AA rs3808607 genotype and CT rs1050504 genotype are coinherited, susceptibility to develop TB becomes very important (OR 13,5, IC 95% 1,72–105,9; $p = 0,0006$). Our findings suggest that genetic variations in the *NSMAF* and *CYP7A1* genes could modulate the risk of pulmonary TB development in the Moroccan population. On the other hand, we have shown that tuberculosis patients have lower levels of retinol in plasma compared to healthy controls. Our data also revealed sexual discrimination in vitamin A deficiency, where retinol concentrations were lower in men with tuberculosis compared to healthy ones.

Key words: tuberculosis, Moroccan, *CYP7A1*, *NSMAF*, vitamin A.