

2013-172.8-02/03

TLEMCEM N° D'ORDRE

UNIVERSITE DE TLEMCEM- ABOU-BEKR BELKAID

FACULTE SNV/STU- DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie



Mémoire

Présenté pour obtenir le grade

DE MASTER II EN BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Option : Alimentation et nutrition

Par

Asma MOSTEFAOUI

Soutenu le

03/07/2013

Inscrit Sous le N°	7076
Date le	03/07/2013
Cours	2013



Intitulé :

**Conception des amorces encadrant le SNP rs3211908 du gène CD36  
associé à l'obésité**

JURY :

Dr ARIBI Mourad  
Dr HADDOUCHE Mustapha  
M<sup>me</sup> BRAHAMI Nabila

Maitre de conférences A  
Maître de conférences B  
Maître-assistant A

Président  
Examineur  
Encadreur

03juillet 2013

## *Remerciements*

*Au terme de ce travail, qu'il nous soit permis de remercier vivement tous ceux qui ont contribué ,de près ou de loin , à sa réalisation et notamment je commencerai par mon encadreur Mme Brahami Nabila ,pour m'avoir guidé afin de mener à bien mon étude Sa disponibilité durant toutes les étapes de ce travail , ses remarques pertinentes et ses suggestions ont sans cesse permis l'amélioration de ce document, et pour ses précieux conseils.*

*Je tiens à remercier tout particulièrement les membres du jury pour leur ferveur et dévotion, ainsi que leur honorable présence*

- Docteur Mourad ARIBI, Directeur du laboratoire BIOMOLIM, UABT*
- Docteur HADDOUCHE Mustapha, Maître de conférences B*

*Je voudrai également exprimer mes sincères remerciements à tous les enseignants du département biologie option alimentation et nutrition.*



**Merci à tous**

## Dédicaces

*C'est grâce à Dieu Tout-Puissant, que je remercie de ses bénédictions et de m'avoir aidé à terminer ce document.*

- ✓ *Je dédie ce modeste travail à mon Père « Ahmed » et ma Mère « Halima » à qui je dois tout vous avez été pour moi l'exemple du courage et de l'optimisme.*
- ✓ *A qui j'adresse tous mes respects et affection en témoignage de leur soutien, sacrifice et patience, ainsi que pour leurs précieux conseils et orientation dans ma vie.*
- ✓ *A mes frères Sidi Mohamed El amine et Ismail, ainsi que mes sœurs Sarah et Aya Fatima Zohra, pour leur soutien et leur affection et que l'esprit de famille nous unit toujours.*
- ✓ *A ma grand-mère « Dada Mama ».*
- ✓ *A mes amis Sarah, Nacira, Amina , Karima et Hafsa .*
- ✓ *A toute ma promotion de 2<sup>ème</sup> année master alimentation et nutrition et surtout mes deux amis « Aicha Mahi et Soumia Touati »*
- ✓ *A tous ceux que je porte dans mon coeur.*



---

*Asma*

## *Liste des abréviations*

ADN : acide désoxy ribonucléique.

AGLC : des acides gras à longue chaîne.

BMI : body mass index.

CD36 : Cluster of differentiation-36.

dNTP : désoxynucléosides triphosphates.

ddNTP : les didésoxyribonucléotides .

FAT/CD36 : translocase d'acide gras.

HDL : lipoprotéines de haute densité.

IMC : l'indice de masse corporelle.

Kg : kilo gramme.

LDLox : des lipoprotéines oxydées de basse densité.

LIMP-2 :lysosomal integral membrane protein-2

MARCO :macrophage receptor with collagenous structure

OMS : organisation mondiale de la santé.

Pb : paire de base.

PCR : Polymerase Chain Reaction.

RFLP : polymorphisme de longueur des fragments de restriction.

rs : référence SNP (polymorphismes nucléotidiques simples).

SNP : polymorphismes nucléotidiques simples.

SR-B : les récepteurs scavengers de classe B.

TG : triglycérides.

# Table des Matières

# TABLE DES MATIERES

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1. Revue de la littérature</b>	
I. L'obésité .....	3
I.1. Définition de l'obésité .....	3
I.2. Étiologie de l'obésité .....	3
a. Diagnostic de l'obésité .....	3
b. Evaluation du sujet Obèse.....	4
c. Complications .....	6
d. Prévalence de l'obésité.....	8
e. Le rôle des facteurs génétiques dans l'étiologie de l'obésité .....	8
II. Le Récepteur CD36 .....	9
II.1. Le gène du récepteur CD36 .....	10
II.2. Structure du récepteur CD36 .....	11
II.3. Distribution et régulation de l'expression du récepteur CD36 .....	13
II.4. Les Fonction de CD36 .....	14
II.5. Les mutations du gène CD36 .....	14
• Les polymorphismes décrits de CD36 .....	15
II.6. Rôle du récepteur CD36 dans la détection des lipides aux niveaux lingual, Intestinal et cérébral: Impact sur les préférences alimentaires et le risque d'obésité .....	15
• Détection entérocytaire des lipides alimentaires : rôle émergent du CD36 .....	16
III. Principe de l'amplification par PCR .....	17
III.1. Les critères de choix des amorces .....	19
<b>Chapitre II : Matériel et méthodes</b>	

1. Conception des amorces pour la PCR.....	20
1.1. Sélection des amorces .....	20
1.1.1. La longueur de l'amorce .....	20
1.1.2. La température de fusion ( $T_f$ ) .....	20
1.1.3. La spécificité .....	20
1.1.4. Les séquences d'amorce complémentaires .....	21
1.1.5. La teneur en G/C et suites polypyrimidine (T, C) ou polypurine (A, G) .....	21
1.1.6. La séquence à l'extrémité 3' .....	21
2. Recherche de la séquence de référence du gène CD36 .....	22
3. Le design des Primers .....	23
4. Analyse des Résultats du Primer Blast .....	23

### **Chapitre III : Résultats et perspectives**

1. Résultat de la conception des amorces .....	25
2. Confirmation des résultats.....	26
3. Perspectives.....	28
<b>Conclusion .....</b>	<b>31</b>

### **Référence bibliographiques**

Liste des tableaux :

**Tableau1** : Définition et classification des obésités de l'adulte d'après l'OMS.....4

**Tableau 2** : Principales complications somatiques des obésités.....7





# Partie Bibliographique

## Introduction

---

L'obésité est un problème majeur de santé qui peut contribuer au risque de complications métaboliques. Sa pathogénie implique un dérèglement de l'équilibre énergétique à la suite de modification des interactions complexes entre des facteurs environnementaux et génétiques.

Il est bien établi qu'il existe un large éventail de variabilité inter-individuelle dans les profils lipidiques sériques et que cette variabilité affecte la susceptibilité à des maladies telles que le syndrome métabolique, le diabète ou la maladie de l'artère coronaire. Des recherches récentes sur le récepteur scavenger CD36 a mis en évidence sa contribution aux différences individuelles dans les lipides sériques et de certaines complications métaboliques de l'obésité. La protéine CD36 est un récepteur scavenger de classe B identifiée à l'origine comme une glycoprotéine plaquettaire. La protéine est exprimée de manière ubiquitaire sur une variété de types de cellules, y compris les adipocytes, les myocytes, les monocytes, les macrophages, les plaquettes, les hépatocytes, les cellules endothéliales vasculaires et les entérocytes intestinaux (1,2).

Le récepteur CD36 est impliqué dans l'absorption des acides gras à longue chaîne (AGLC) et des lipoprotéines oxydés de basse densité (oxLDL). La transduction du signal provoquée par la liaison du ligand CD36 implique la protéine dans les voies cellulaires relatives à certaines complications métaboliques de l'obésité, comme la résistance à l'insuline, de l'inflammation, de l'athérosclérose et de la thrombose comme précédemment rapporté par Collot-Teixeira S et al. (3,2).

De récentes études génétiques d'association ont donné des résultats divergents liés à la contribution à l'obésité de variantes communes du gène *CD36*. Bokor et collaborateurs ont identifié quatre SNP du gène *CD36* (rs3211867, rs3211883, rs3211908 et rs1527483) associés à l'obésité (4).

Notre travail constitue une étape préliminaire à la recherche d'association du SNP rs 3211908 du gène *CD36* à l'obésité dans la population Algérienne ; cette étape est la conception d'amorces encadrant la variation rs 3211908. Ces séquences d'oligonucléotides serviront à amplifier la séquence contenant le SNP recherché lors d'une réaction de polymérisation en chaîne.

La réaction PCR (Polymerase Chain Reaction) permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier (5).



## Introduction

---

Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes : une dénaturation de l'ADN par chauffage pour séparer les deux brins qui le composent, une hybridation des amorces aux extrémités de la séquence recherchée, puis une élongation grâce à l'action d'une ADN polymérase c'est à dire synthèse d'un nouveau brin par la Taq polymérase à partir des amorces et de dNTP libres. Il en résulte deux ADN bicaténaires (5).

L'efficacité et la sensibilité de la PCR dépendent en grande partie sur l'efficacité des amorces (6). La possibilité pour un oligonucléotide à servir d'amorce pour PCR dépend de plusieurs facteurs, notamment: a) la cinétique d'association et de dissociation du duplex amorce-matrice à le recuit et l'extension des températures; b) la stabilité du duplex de nucléotides dépareillées et leur emplacement; et c) l'efficacité avec laquelle la polymérase est capable de reconnaître et d'étendre un duplex incompatibles. Les amorces qui sont uniques pour la séquence cible à amplifier doivent remplir certains critères tels que la longueur de l'amorce, GC%, recuit et de la température de fusion, 5 'la stabilité de la fin, l'extrémité 3' spécificité (7).

L'objectif de ce travail est de concevoir, avec spécificité, le couple d'amorce encadrant le SNP rs 3211908 du gène CD36 associé à l'obésité dans la population européenne (4), afin d'étudier son implication dans l'obésité chez la population Algérienne ; lors d'études cas-témoins ultérieurs.

## I. L'obésité :

### I.1. Définition de l'obésité :

Le terme obésité est dérivé du latin « OBESUS » qui veut dire engraisser (8) L'obésité est une maladie chronique évolutive. L'obésité est souvent définie simplement comme une accumulation anormale ou excessive de graisse dans les tissus adipeux, pouvant engendrer des problèmes de santé (9).

### I.2. Étiologie de l'obésité :

L'obésité résulte de l'interaction de facteurs environnementaux (alimentation inappropriée comportements et / ou réduction de l'activité physique) et les facteurs héréditaires. Cela a été démontré par de nombreuses études épidémiologiques menées sur différentes populations (10). L'obésité a une expression phénotypique très hétérogène et les mécanismes moléculaires impliqués dans son développement sont très diversifiés.

#### a. Diagnostic de l'obésité :

L'obésité correspond à « un excès de masse grasse entraînant des conséquences néfastes pour la santé » (11). Chez l'adulte jeune en bonne santé, la masse grasse corporelle représente 10-15 % du poids chez l'homme et 20-25 % chez la femme (12).

En pratique, le statut pondéral est défini à partir de l'**indice de masse corporelle (IMC**, en anglais body mass index, BMI) qui est le rapport du poids (en kg) sur le carré de la taille (en mètre) (kg/m<sup>2</sup>).

Par exemple : un adulte qui pèse 70 kg et qui mesure 1,75 m aura un IMC de 22,9 :  $IMC = \frac{70(kg)}{1,75^2 (m^2)} = 22,9$

Chez l'adulte (après 18 ans), l'obésité est définie par un  $IMC \geq 30$  kg/m<sup>2</sup>, associé à une augmentation du risque de co-morbidité et de mortalité. Les seuils sont les mêmes chez l'homme et chez la femme (Tableau 1).

## Synthèse bibliographique

**Tableau 1.** Définition et classification des obésités de l'adulte d'après l'OMS

Classification	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	
	Seuils principaux	Seuils additionnels
<b>Insuffisance pondérale</b>	< 18,50	< 18,50
Maigreur grave	< 16,00	< 16,00
Maigreur modérée	16,00 - 16,99	16,00 - 16,99
Maigreur légère	17,00 - 18,49	17,00 - 18,49
<b>Poids normal</b>	18,50 - 24,99	18,50 - 22,99
		23,00 - 24,99
<b>Surpoids</b>	≥ 25,00	≥ 25,00
Préobésité	25,00 - 29,99	25,00 - 27,49
		27,50 - 29,99
<b>Obésité</b>	≥ 30,00	≥ 30,00
Obésité, classe I	30,00 - 34,99	30,00 - 32,49
		32,50 - 34,99
Obésité, classe II	35,00 - 39,99	35,00 - 37,49
		37,50 - 39,99
Obésité, classe III	≥ 40,00	≥ 40,00

*Source : adaptation de publications de l'OMS (OMS 1995, 2000 et 2004).*

Les sujets obèses montrent des différences non seulement dans les excédents de graisse qu'ils accumulent, mais aussi dans la répartition anatomique de cette graisse. Cette répartition de la masse grasse joue un rôle dans les risques associés à l'obésité et le type de maladie qui en résulte. En effet, une répartition abdominale de la graisse est un facteur de risque de maladie aussi important que l'excès de masse grasse en soi. Il est donc utile de pouvoir distinguer les sujets présentant un risque augmenté du fait d'une «répartition abdominale de la graisse», souvent connue sous le nom d'«obésité androïde», de ceux qui montrent une répartition «gynoïde» moins grave, dans laquelle la graisse se répartit plus uniformément et de façon Périphérique (11).

### **b. Evaluation du sujet Obèse:**

L'examen clinique d'un sujet obèse est long, mais réunir tous ces éléments est indispensable pour élaborer un programme thérapeutique cohérent.

- **Histoire pondérale** récente et ancienne (évolution du poids au cours du temps qui permet d'identifier l'âge de début de la prise excessive de poids et les variations pondérales)

## Synthèse bibliographique

---

- **Les circonstances les plus fréquentes de prise de poids** à rechercher sont : modification du statut hormonal (puberté, grossesse, ménopause) ; choc émotionnel (dépression, deuil) ; changement d'environnement familial (mariage, divorce) ou professionnel (perte d'emploi) ; sevrage tabagique ; arrêt du sport ; intervention chirurgicale imposant une immobilisation prolongée ; médicaments (antidépresseurs tricycliques, neuroleptiques, lithium, glucocorticoïdes, insuline) ; exceptionnellement : traumatisme crânien, chirurgie de la région hypothalamo-hypophysaire, hypothyroïdie profonde (12) .
- Seront précisés les **antécédents familiaux** d'obésité, de pathologies cardio-métaboliques (diabète, dyslipidémies, hypertension artérielle) et de cancer.
- L'**enquête alimentaire** précise les rythmes alimentaires et recherche les facteurs augmentant la densité calorique de l'alimentation (kcal/g), un excès de graisses alimentaires (beurre, fromage, graisses de cuisson, fritures...), un excès de boissons sucrées (sodas) ou alcoolisées.
- L'**enquête d'activité physique** précise le niveau habituel d'activité physique (professionnel, loisirs, sports), habituellement faible, et de sédentarité (temps devant écran, temps assis), habituellement élevé, et chez l'enfant la participation aux activités sportives extra-scolaires.
- L'existence d'une **dépression** ou d'un autre trouble psychologique est fréquente mais non spécifique. Par ailleurs, de nombreux traitements psychotropes (certains thymorégulateurs, neuroleptiques, anti-dépresseurs, anti-épileptiques) peuvent entraîner une prise de poids.

### ●Examen physique

Evaluation du statut pondéral et de la répartition du tissu adipeux. L'IMC permet d'estimer l'importance de l'obésité.

Certaines prises de poids ne sont pas liées à une augmentation de masse grasse et doivent être reconnues : syndrome oedémateux généralisé (anasarque), augmentation importante de masse musculaire (sportifs de haut niveau).

**Le tour de taille** : Une répartition de la graisse sur la partie supérieure du corps, obésité androïde, est plutôt observée chez l'homme mais également chez la femme après la ménopause. Une répartition sur la partie basse du corps, obésité gynoïde, est plutôt typique de l'obésité féminine. Cette distinction clinique reste schématique.



## Synthèse bibliographique

---

Chez l'adulte, les seuils dénotant une augmentation du risque de pathologies métaboliques et vasculaires sont différents chez l'homme et chez la femme :

■  $\geq 80$  cm chez la femme,  $\geq 94$  cm chez l'homme : niveau 1

■  $\geq 88$  cm chez la femme,  $\geq 102$  cm chez l'homme : niveau 2

La mesure du tour de taille a surtout un intérêt quand l'IMC est inférieur à 35 kg/m<sup>2</sup>

**Recherche de complications** par un examen détaillé. L'examen clinique est très important car la recherche des complications de l'obésité ne doit pas se limiter aux seules anomalies métaboliques. Le syndrome d'apnées du sommeil doit faire l'objet d'un interrogatoire systématique (interrogatoire à la recherche en priorité d'un ronflement, d'apnées nocturnes constatées par l'entourage et d'une somnolence diurne) (12).

### ● Recherche d'une cause d'obésité secondaire

Même si ces étiologies sont exceptionnelles, il faudra savoir évoquer une hypothyroïdie, un hypercorticisme (obésité facio-tronculaire associée à des signes de catabolisme ; à noter que la présence de vergetures rosées voire pourpres est banale surtout dans les obésités de constitution rapide ou après plusieurs pertes de poids massives suivies de reprises pondérales), une tumeur hypothalamique ou hypophysaire (troubles du sommeil, hypogonadisme, syndrome polyuro-polydipsique, troubles visuels) ou encore un syndrome génétique rare avec obésité (histoire familiale, obésité précoce associée à un syndrome malformatif) (12).

### ● Examens complémentaires:

Examens systématiques glycémie à jeun, bilan lipidique (EAL : triglycérides, cholestérol total et HDL, calcul du taux de LDL), uricémie, GGT, transaminases, NFS, ionogramme sanguin, créatinine, et ECG de repos. En fonction du contexte clinique, seront demandées : une polygraphie ventilatoire nocturne de dépistage (recherche d'un syndrome d'apnée du sommeil), épreuves fonctionnelles respiratoires, gazométrie artérielle, épreuve d'effort ECG...

La recherche d'une **cause endocrinienne** est orientée par le contexte clinique : par ex. TSHus (hypothyroïdie), freinage minute à la dexaméthasone (suspicion d'hypercorticisme) (12).

### c. Complications :

De nombreuses complications somatiques de l'obésité sont favorisées par une répartition abdominale de la graisse (Tableau 2).

## Synthèse bibliographique

**Tableau 2. Principales complications somatiques des obésités (12).**

CARDIOVASCULAIRES	Hypertension artérielle* Insuffisance coronarienne* Hypertrophie ventriculaire gauche (HVG) Accidents vasculaires cérébraux* Thromboses veineuses profondes – Embolie pulmonaire Insuffisance cardiaque
RESPIRATOIRES	Dyspnée d'effort, syndrome restrictif Syndrome d'apnées du sommeil* Hypoventilation alvéolaire Asthme
MECANIQUES	Gonarthrose, coxarthrose, lombalgies
DIGESTIVES	Stéatose hépatique, NASH* Hernie hiatale, reflux gastro-oesophagien Lithiase biliaire*
CANCERS	Homme : prostate, colon Femme : sein, ovaire, endomètre, col utérin
METABOLIQUES/ENDOCRINIENNES	Insulinorésistance*, Syndrome métabolique* Diabète de type 2* Hypertriglycéridémie*, HypoHDLémie* Hyperuricémie*, Goutte Dysovulation, syndrome des ovaires polykystiques* Infertilité Hypogonadisme (homme, obésité massive)
CUTANÉES	Hypersudation Mycoses des plis
RENALES	Acanthosis Nigricans*
RISQUE OPERATOIRE	Protéinurie, hyalinose segmentaire et focale
AUTRES	Hypertension intracrânienne



## Synthèse bibliographique

	Complications obstétricales
--	-----------------------------

*Le signe \* indique les complications pour lesquelles une répartition abdominale du tissu adipeux est considérée comme facteur de risque indépendant de la corpulence globale*

- Parmi les complications **psychosociales**, la discrimination envers les sujets obèses ainsi que la dépression peuvent altérer significativement la qualité de vie. "L'idéal de minceur" de la société contemporaine peut participer au développement de troubles du comportement alimentaire (restrictions alimentaires puis compulsions) qui favorisent la prise de poids (12).

#### **d. Prévalence de l'obésité :**

Depuis la fin des années 1990, l'obésité a atteint le stade d'épidémie mondiale ; L'OMS estimait en 2008 que 1,5 milliard de personnes de plus de 20 ans étaient en surpoids, parmi lesquelles près de 200 millions d'hommes et 300 millions de femmes étaient obèses. En 2010, le surpoids concernait près de 43 millions d'enfants de moins de cinq ans (11).

En Algérie, la prévalence de l'obésité totale et abdominale est de 9.1% [7.1-11.0] et 15.3% [13.0-17.6] chez les hommes et 30.1% [27.8-32.4] et 52.0% [49.1-54.9] chez les femmes.

Le contraste urbain vs rural modéré est un peu plus marqué chez les femmes (obésité totale 31.6% vs 27.2%,  $p < 0.01$ , obésité abdominale 55.3% vs 45.7%,  $p < 0.00001$ ) que chez les hommes (obésité totale 8.6% vs 9.8%, obésité abdominale 16.0% vs 14.2%,  $p = 0.25$ ).

Le contraste région géographiques (région 1 tell, région 2 hautes plaines, région 3 sud) est plus marqué pour l'obésité totale (10.0% vs 5.7% vs 13.3%,  $p < 0.0001$ ) et chez les femmes pour l'obésité abdominale (51.6% vs 55.4% vs 37.0%,  $p < 0.0001$ ) (13).

Les résultats montrent que l'obésité est fréquente en Algérie. Les différences observées entre urbains versus ruraux et entre régions géographiques sont en grande partie expliquées par les différences démographiques et socio économiques. Les transitions épidémiologique et nutritionnelle soulèvent la problématique de stratégie d'intervention sanitaire à lancer sur le terrain (13).

#### **e. Le rôle des facteurs génétiques dans l'étiologie de l'obésité :**

## Synthèse bibliographique

---

Selon plusieurs études, 30 à 80% de la variation de poids pourrait être déterminée par des facteurs génétiques. Aujourd'hui, la contribution des facteurs génétiques à l'obésité peut être résumée comme suit ;

- **Obésité monogénique :** Des mutations uniques contribuent au développement de l'obésité. Ces formes d'obésité sont rares, très sévères et généralement dès l'enfance (14). A ce jour, près de 200 cas d'obésité chez l'homme ont été associés à une seule mutation génique (15,16). Ces cas, qui obéissent à la génétique mendélienne, sont caractérisées par des phénotypes extrêmement graves qui se présentent dans l'enfance et sont souvent associées à des paramètres comportementaux, développementaux et des troubles endocriniens (17).
- **Obésité syndromique:** Il ya entre 20 et 30 troubles mendéliens dans lesquelles les patients sont cliniquement obèses, mais sont en outre distingués par un retard mentale, une dysmorphie faciale et des anomalies de développement spécifiques d'organes (16,17). Ces syndromes proviennent d'anomalies génétiques discrètes ou d'anomalies chromosomiques, et peuvent être soit autosomique ou liés à l'X.
- **Obésité polygénique:** plusieurs variantes génétiques interagissent avec un environnement «à risque» dans obésités commune, où chaque gène de susceptibilité, pris individuellement, ne ferait qu'avoir un léger effet sur le poids. La contribution cumulée de ces gènes deviens importante lorsqu'il existe une interaction avec les facteurs de l'environnement prédisposant à leur expression phénotypique (suralimentation, diminution de l'activité physique, les changements hormonaux et les facteurs socio économiques).

De récentes études génétiques d'association ont donné des résultats divergents liés à la contribution à l'obésité des variantes communs du gène CD36. Bokor et al Identifié quatre SNP du gène CD36 (rs3211867, rs3211883, rs3211908, rs1527483 et) avec l'association à des mesures de l'obésité (4).

### **II. Le Récepteur CD36 :**

Le CD36 (Cluster of differentiation-36), découvert en 1976, est un récepteur membranaire intégral qui fait partie de la grande famille des récepteurs éboueurs ou scavengers. Cette famille de récepteurs transmembranaires comprend plusieurs sous-familles de récepteurs qui présentent une grande variété structurelle incluant, entre autres, les récepteurs scavengers de classes A (SR-A), dont SR-AI, SR-AII et MARCO (*macrophage receptor with collagenous structure*) et les récepteurs scavengers de classe B (SR-B), qui incluent, outre notre récepteur d'intérêt CD36, CLA-1 (ou SR-BI chez la souris), LIMP-2 (*lysosomal integral membrane protein-2*) aussi appelé SR-BII, Emp et Croquemort. D'autres récepteurs scavengers sont

## Synthèse bibliographique

aussi connus dont LOX-1 (*lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor*) et CD68 (macrosialine). De façon générale, les récepteurs scavengers sont impliqués dans l'internalisation de certains ligands, dans l'adhésion cellulaire ainsi que dans le transfert d'acides gras de part et d'autre de la membrane plasmique. Le CD36 a d'abord été identifié sur la membrane des plaquettes sanguines comme étant la glycoprotéine IV (gpIV) (18,19). Quelques années plus tard, des études ont montré que le CD36 était aussi un récepteur pour les lipoprotéines modifiées exprimé par les monocytes/macrophages (20) et un transporteur pour les acides gras au niveau des adipocytes (21). Le CD36 est aussi connu sous l'appellation FAT/CD36 (translocase d'acide gras), SCARB3, GP88 et gpIIb. Il est exprimé par une grande variété de cellules, ce qui en fait un récepteur multifonctionnel jouant un rôle au niveau du système cardiovasculaire, le métabolisme des acides gras, l'angiogenèse et la biologie des plaquettes sanguines, ainsi que dans différentes pathologies telles l'athérosclérose, la maladie d'Alzheimer et le diabète (22).

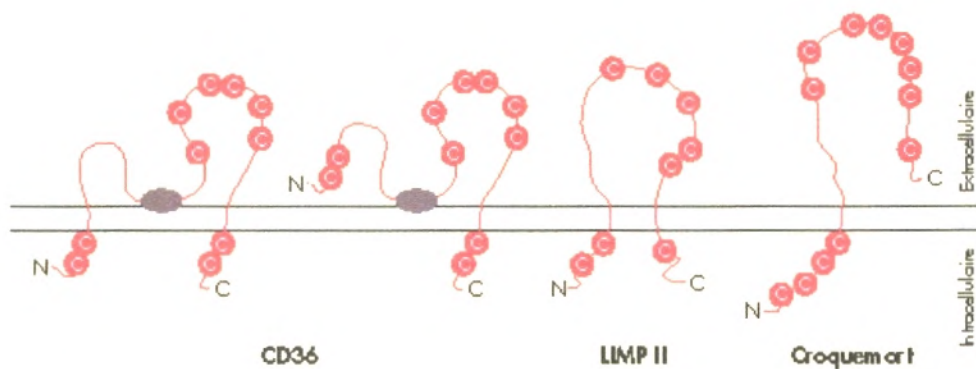
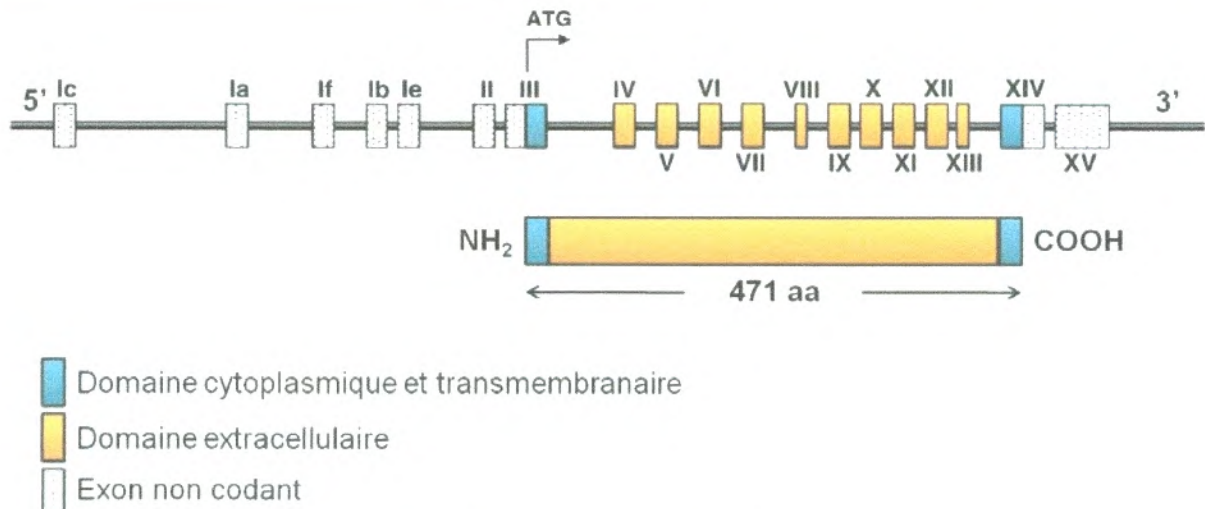


Figure 1 : Représentation schématique de la topologie du CD36 et des protéines LIMPII et Croquemort. Ces modèles structuraux schématisent les différents types de topologie envisagés pour les protéines de la famille du CD36 : résidu cystéine, : domaine associé à la membrane ou formant une poche hydrophobe. (Figure modifiée de (23))

### II.1. Le gène du récepteur CD36 :

Le gène CD36 est localisé sur le chromosome 7q11.2 chez l'humain et sur les chromosomes 4 et 5 chez le rat et la souris, respectivement. Le gène CD36 est constitué de 15 exons, mais seulement une partie de l'exon 3, l'exon 4 à 13 et une partie de l'exon 14 codent pour la protéine CD36 (Figure 2) (24,25).



**Figure 2. Représentation schématique du gène CD36**

Le gène CD36 est constitué de 15 exons. La région non-transcrite en 5' est constituée de l'exon 1a, 1b, 1c, 1e, 1f, 2 et d'une partie de l'exon 3. Le restant de l'exon 3, les exons 4 à 13 et une partie de l'exon 14 codent pour la protéine CD36, tandis que le reste de l'exon 14 et l'exon 15 forment la région non-transcrite en 3' (Figure modifiée de (24)).

### II.2. Structure du récepteur CD36 :

Le CD36 est une glycoprotéine de 472 acides aminés. Il a une structure en épingle à cheveux avec un grand domaine extracellulaire et deux courts domaines transmembranaires, situés du côté N-terminal et du côté C-terminal assurant l'ancrage de la protéine dans la membrane plasmique. On note également deux extrémités cytoplasmiques, respectivement de 6 acides aminés en N-terminal (acides aminés 1-6) et 9 acides aminés en C-terminal (acides aminés 463-472), contenant plusieurs résidus d'acides aminés susceptibles d'être modifiés de manière post-traductionnelle.

Il a été démontré que le CD36 est palmitoylé au niveau des cystéines 3, 7, 464 et 466 (26). La palmitoylation du CD36 pourrait être à l'origine de son ciblage dans les micro-domaines particuliers de la membrane, les cavéoles, où il a été co-localisé avec la Cavéoline-1 (27). En effet, les études réalisées sur des cellules H4IIE transfectées avec des CD36 mutés au niveau C-terminal ont confirmé un rôle important de cette zone dans sa localisation membranaire, et dans son recrutement au niveau de microdomaines. Ce phénomène pourrait favoriser son rôle dans le captage des acides gras (28). De plus, il a été démontré que la partie C-terminale du CD36 peut interagir avec les Src kinases, Fyn, Lyn et Yes, ce qui explique son implication dans la signalisation cellulaire (29). Pour finir les résidus lysine en position 469 et 472 peuvent être « ubiquitinés » constituant un signal à l'origine de la dégradation par la voie du

## Synthèse bibliographique

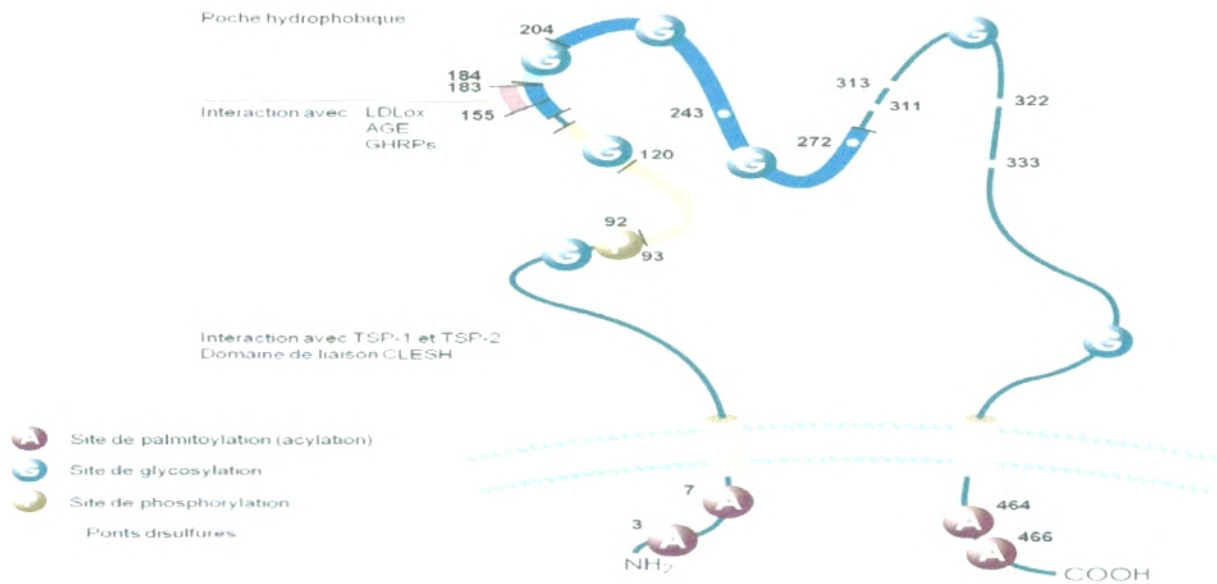
---

protéasome de la protéine (30). Ces différentes modifications post-transcriptionnelles du CD36 montrent la complexité de la régulation de la fonction de cette protéine.

Le domaine extracellulaire (acides aminés 31-439) du CD36 contient 10 sites potentiels de glycosylation. La taille de la protéine dépend du degré de glycosylation (de 53 à 88 kDa) qui est variable selon l'origine tissulaire de la protéine. Ce domaine constitue une poche hydrophobe où le CD36 peut accueillir une large variété de ligands. En effet, le CD36 lie les AGLC au niveau de la poche hydrophobe (acides aminés 127-279).

Mais le CD36 lie également le collagène, les phospholipides anioniques, les LDL oxydées, au niveau des résidus d'acides aminés 155 à 183, le *Plasmodium falciparum* (acides aminés 146-154), la thrombospondine (acides aminés 93 à 120) et la  $\alpha$ -amyloïde. La variété des ligands explique les multiples fonctions du CD36 (31,32 ,33).

En effet, dans les cellules endothéliales microvasculaires, en liant la thrombospondine-1, le CD36 joue un rôle de régulateur négatif de l'angiogénese. Comme récepteur de matrice extracellulaire en liant le collagène, le CD36 agit comme une molécule d'adhésion qui module l'aggrégation plaquettaire. Dans les macrophages et les cellules dendritiques, à travers sa fonction de scavenger récepteur qui reconnaît spécifiquement les phospholipides anioniques et les lipoprotéines oxydées, il participe à l'internalisation des corps apoptotiques, de certaines bactéries et pathogènes fongiques et des LDL oxydées. Ces différentes fonctions expliquent son implication dans des pathologies comme l'athérosclérose, l'inflammation, la maladie d'Alzheimer et la Malaria (31).



**Figure 3. Structure du récepteur CD36**

Le CD36 est un récepteur transmembranaire localisé dans les radeaux lipidiques de la membrane plasmique. Son large domaine extracellulaire contient trois ponts disulfures (Cys243-Cys311, Cys272-Cys333, et Cys313-Cys322), de multiples sites de N-glycosylation et différents domaines de liaison. Les deux petites queues cytoplasmiques contiennent des cystéines palmitoylées. La Tyr463 et Cys464 en C-terminal sont importantes pour la liaison des ligands et la cascade de signalisation intracellulaire (Figure inspirée de (31, 24)).

### II.3. Distribution et régulation de l'expression du récepteur CD36 :

La régulation de l'expression du récepteur CD36 a largement été étudiée dans les monocytes et les macrophages et quelques autres types cellulaires.

L'expression du CD36 peut être régulée autant au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel que traductionnel et peut être modulée par l'adhérence et la différenciation cellulaire, ainsi que par divers médiateurs solubles ou par des récepteurs nucléaires, dont le principal est le *peroxisome proliferator-activated receptor*  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) (34, 35, 36,37, 38, 39,40). La régulation de l'expression du CD36 passe aussi par la redistribution d'un pool intracellulaire du récepteur vers la membrane plasmique (36, 41 ,42).

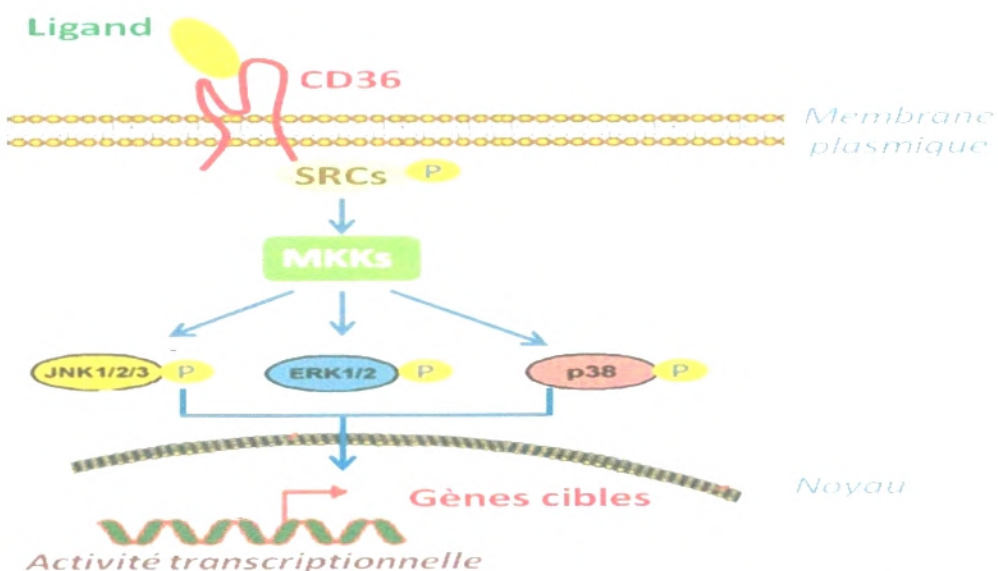
Le récepteur CD36, de par son rôle facilitateur de la translocation des acides gras, est aussi exprimé dans les adipocytes, le muscle cardiaque et les muscles squelettiques ainsi que sur la muqueuse intestinale où l'on retrouve différents niveaux d'expression selon la région intestinale. Le CD36 est principalement exprimé dans la partie proximale du petit intestin,

incluant le duodénum et le jéjunum (43, 44). Le récepteur est aussi exprimé au niveau des kératinocytes, des érythrocytes, des réticulocytes, ainsi qu'au niveau des cellules épithéliales mammaires et rénales, des cellules dendritiques, des cellules de la microglie et de l'épithélium pigmentaire rétinien (45, 22).

Dans le muscle, le CD36, qui est emmagasiné au niveau de vésicules endosomales, est acheminé vers la membrane plasmique en réponse à une contraction ou après une stimulation par l'insuline (46,47, 41, 48). Il est à noter que chez les sujets souffrant d'obésité et de résistance à l'insuline, le CD36 est retenu à la surface cellulaire en conséquence d'un dérèglement du recyclage du CD36 entre le compartiment intracellulaire et la membrane plasmique. Cette situation entraîne une accumulation de triacylglycérol dans le muscle conduisant à une utilisation préférentielle des acides gras comme substrat énergétique au détriment du glucose (49, 50).

### II.4. Les Fonction de CD36 :

Le CD36 interagit avec un certain nombre de ligands, y compris le collagène de type I et IV, la thrombospondine, les érythrocytes parasités par *Plasmodium falciparum*, les plaquettes agglutinant protéine p37, les lipoprotéines oxydées de basse densité et d'acides gras à longue chaîne. Sur les macrophages le CD36 fait partie d'un récepteur non opsonique (le récepteur scavenger CD36/ $\alpha$ V  $\beta$ 3 complexe) et est impliqué dans la phagocytose.



**Figure 4 : Cascade de signalisation déclenchée par la liaison du CD36 avec son ligand.**

*L'interaction entre CD36 et son ligand déclenche une cascade de signalisation cellulaire via*

## Synthèse bibliographique

---

*L'activation des kinases comme la famille Src kinases puis les MAP kinase kinases (MKK) et les MAPKs (JNK1/2/3, ERK1/2 et p38). Ce signal modulerait la réponse cellulaire via des facteurs de transcription et leurs gènes cibles*

Le CD36 a également été impliquée dans l'hémostase , la thrombose , le paludisme , l'inflammation , des métabolisme du lipides et de l'athérogenèse .

Récemment, le CD36 a été liée au stockage du calcium exploité, l'activation de la phospholipase A<sub>2</sub>, et la production de prostaglandine E<sub>2</sub> (51).

### **II.5. Les mutations du gène CD36 :**

Les mutations suivantes du gène CD36 ont été décrits à ce jour: substitutions nucléotidiques (52,53), de petites délétions (54,55,56), de petites insertions (57,58), la suppression brut (59), la reproduction (57), des réarrangements complexes (54), et la variation de répétition, une répétition dinucléotide (TG) n dans l'intron 3 (60,61), où le nombre de répétitions n = 12 participe à la non-production de la variante de CD36 qui n'a pas les exons 4 et 5 (60).

#### **• Les polymorphismes décrits de CD36 :**

Les différentes fonctions attribuées au CD36 dont certaines semblent être essentielles à la physiologie cellulaire. Cependant, certains individus présentent une déficience partielle ou totale en CD36 (phénotype Naka-négatif) et ne souffrent pourtant d'aucune pathologie associée à ce déficit.

Deux variants dans le gène de CD36 ont été décrits mais uniquement dans la population Japonaise (52, 58,62). Ces variants semblent être responsables de la déficience de CD36 :

- La mutation Pro90Ser semble être responsable de la déficience de type I (CD36 n'est exprimé ni sur les plaquettes, ni sur les monocytes).
- l'insertion d'un nucléotide au codon 317 qui fait apparaître un codon stop prématurément semble être responsable de la déficience de type II (CD36 est exprimé sur les monocytes mais pas sur les plaquettes).

Les variants de typeII sont hétérozygotes pour les allèles C478 et T478 alors que les typesI ne sont porteurs que de l'allèle muté (T478) (52). Ces derniers souffrent d'une déficience complète en CD36.





## Synthèse bibliographique

---

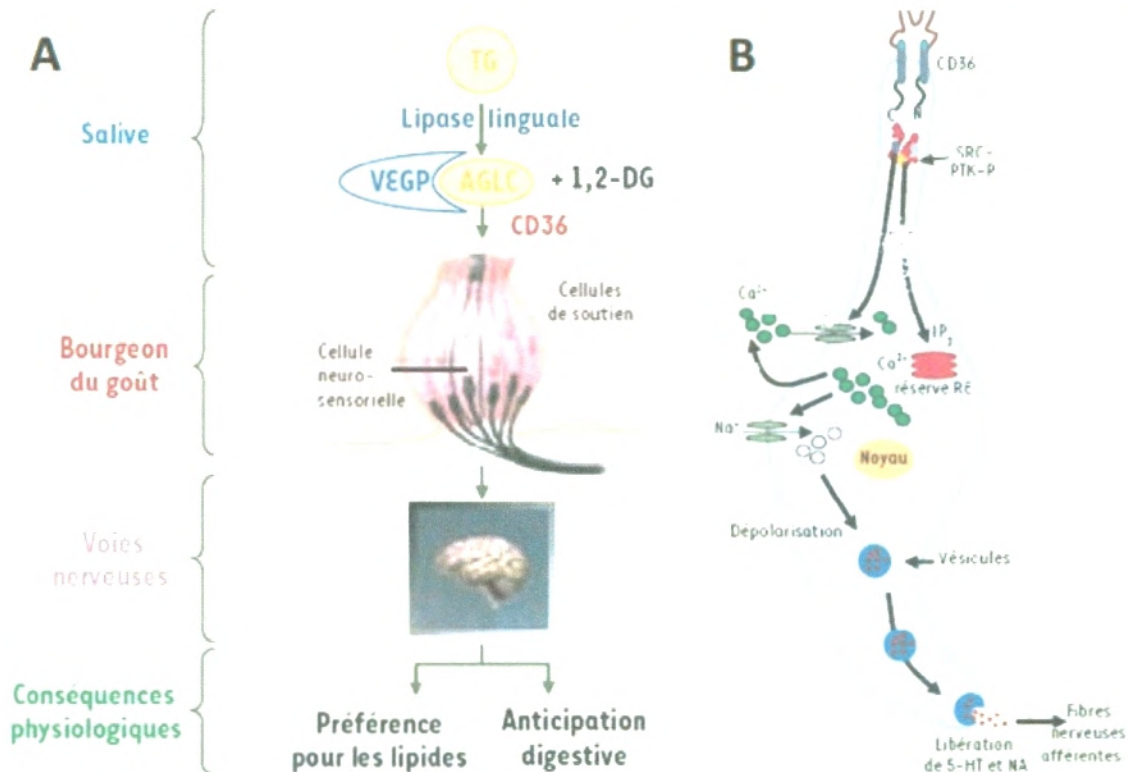
Les deux types de déficience de CD36 ont une fréquence d'environ 3% dans la population japonaise et d'environ 0.3% dans la population américaine d'origine européenne (52), elles sont également presque indétectables dans la population européenne (52).

### **II.6. Rôle du récepteur CD36 dans la détection des lipides aux niveaux lingual, Intestinal et cérébral: Impact sur les préférences alimentaires et le risque d'obésité :**

Le CD36 est un lipido-récepteur jouant un rôle important dans le comportement alimentaire (préférence spontanée pour les aliments riches en lipides, contrôle de l'efficacité de l'absorption des lipides et de la satiété). Les travaux indiquent qu'il existe un continuum fonctionnel le long de l'axe oro-intestinal permettant au cerveau d'analyser et de réguler en temps réel l'ingestion, la digestion, l'absorption et le devenir métabolique des lipides alimentaires. Ce système requiert la présence de capteurs capables de détecter la présence de lipides au niveau lingual, intestinal et cérébral. SensoFAT a permis de montrer que le CD36 joue un rôle essentiel dans ce système. (63)

Au niveau lingual, le CD36 est clairement impliqué dans la perception gustative des lipides alimentaires. Au niveau intestinal, le CD36 permet la détection des lipides pendant la période post-prandiale et d'adapter leur absorption pour la rendre optimale. Il transmet également cette information (présence ou non de lipides au niveau intestinal) au cerveau participant ainsi à la mise en place de la satiété. Enfin au niveau central, le CD36 est trouvé au niveau de certains neurones hypothalamiques connus pour être impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire. (63)

## Synthèse bibliographique



**Figure 5: Implication du CD36 dans la perception orale des lipides alimentaires.**

*A : La détection orale des AGLC via le CD36 informe le système nerveux central qui module le comportement alimentaire et la sécrétion digestive (64).*

*B : Le mécanisme d'action du récepteur CD36 au niveau apical des cellules gustative(65). TG : Triglycérides ; VEGP : Von Ebner's Gland Protein ; 1,2 DG : 1,2 Diglycérides ; CD36 : Fatty Acid Transporter ; Src-PTK-P: Src Protein Tyrosine Kinase phosphorylé; IP3: inositol 1, 4,5- triphosphate; 5-HT: Sérotonine; NA: Noradrénaline.*

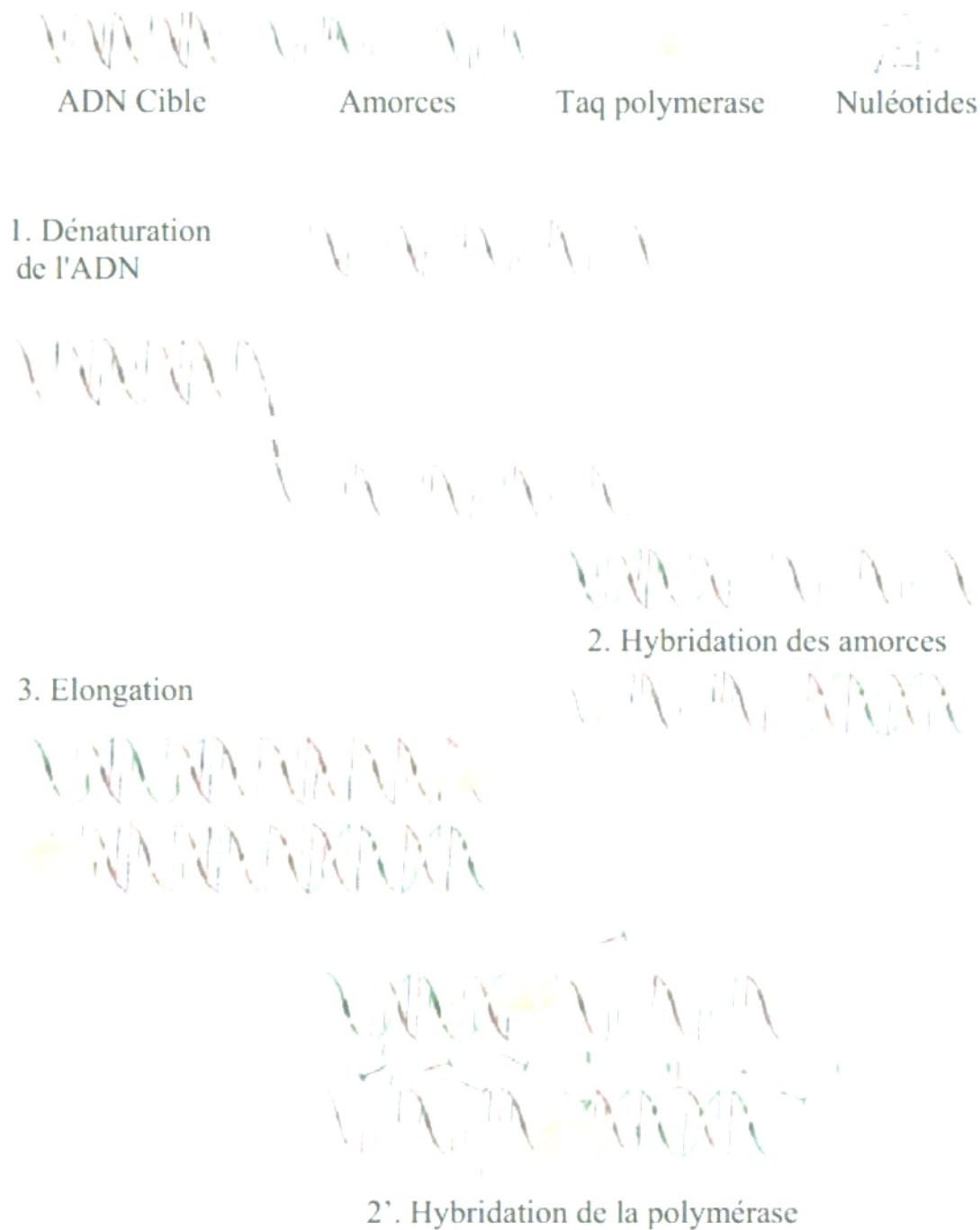
- **Détection entérocytaire des lipides alimentaires : rôle émergent du CD36 :**

Au début de la phase d'absorption intestinale, l'interaction entre CD36 et les AGLC provenant de l'hydrolyse des triglycérides (TG) alimentaires déclencherait une activation du métabolisme intestinal conduisant à la formation de chylomicrons riches en TG donc de grande taille efficacement dégradés dans le sang. Ce rôle de lipido-récepteur pour le CD36 intestinal expliquerait pourquoi les animaux et les patients déficients en CD36 sécrètent de petits chylomicrons à l'origine d'une hypertriglycémie postprandiale (66,67). Le CD36 est donc la première étape d'un mécanisme qui conduit à une adaptation postprandiale du métabolisme entérocytaire des lipides permettant de prendre en charge de grandes quantités de lipides alimentaires.

### III.Principe de l'amplification par PCR :

La PCR (Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérase en chaîne) est une technique d'amplification d'ADN *in vitro*. Elle permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie (68)

Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes : une dénaturation de l'ADN par chauffage pour séparer les deux brins qui le composent, une hybridation des amorces aux extrémités de la séquence recherchée, puis une élongation grâce à l'action d'une ADN polymérase, c'est à dire synthèse d'un nouveau brin par la Taq polymérase à partir des amorces et de dNTP libres. Il en résulte deux ADN bicaténaire. Cette étape se déroule généralement à la température optimale à l'action de la polymérase : 72°C. Sa durée dépend principalement de la longueur de l'amplicon. (69). Ce cycle est répété un grand nombre de fois pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible (68).



**Figure 6 : Principe d'un cycle de PCR.**

L'hybridation des amorces sur la cible est une étape qui conditionne la spécificité de l'amplification. La température de cette étape est spécifique à chaque protocole de PCR car elle dépend de la longueur des amorces et de leur composition en oligonucléotides. Il est recommandé de se placer à une température inférieure de 5°C à la température de fusion des amorces. En général, cette température est comprise entre 50 et 60°C (69).

## Synthèse bibliographique

### III.1. Les critères de choix des amorces :

Dans la mise au point de la réaction PCR, le choix des amorces est crucial. Elles vont avoir un double rôle : en s'hybridant à l'ADN matrice, elles délimitent la région d'ADN à amplifier (hybridation) et avec leur extrémité 3' OH libre servir d'amorce pour l'ADN polymérase (élongation). (5)

Les oligonucléotides amorces s'hybrident aux extrémités de la séquence qui va être amplifiée, il faut donc connaître les séquences nucléotidiques des extrémités de la région ADN amplifiée. C'est en effet au niveau de ces extrémités que les oligonucléotides amorces vont s'hybrider. Pour faciliter le choix des séquences des deux amorces, des logiciels d'analyse de séquences permettent de vérifier les points suivants :

- longueur de 18-24 bases.
- ne pas contenir de structure secondaire interne (épingles à cheveux).
- contenir 40-60 % de GC.
- Ne pas avoir d'extrémités 3' complémentaires (sinon formation de dimères de primers).
- des  $T_m$  comparables. Les oligonucléotides amorces doivent s'hybrider à l'ADN matrice dans les mêmes conditions de température, Avoir une  $T_m$  de 55-65° C (idéalement > 60°). La  $T_h$  est la  $T_m - 5$  °C.
- Une concentration de 0.1 à 0.6 m M est généralement idéale. Plus pourrait conduire à une hybridation non spécifique des primers. Moins pourrait entraîner leur épuisement rapide.

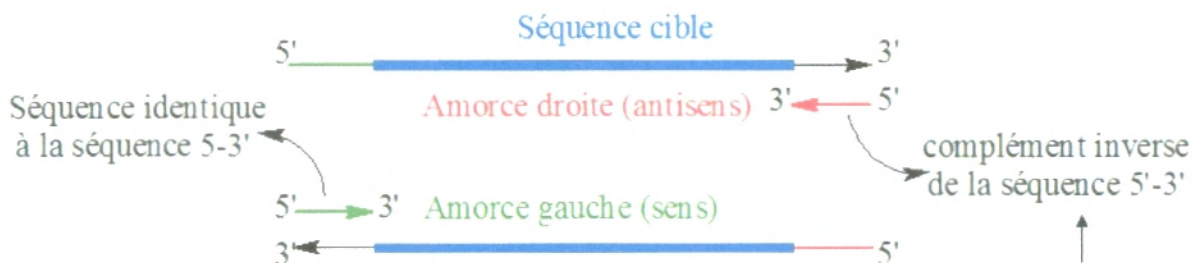


Figure 7 : Amorce gauche et amorce droite

# Partie expérimentale

## **1. Conception des amorces pour la PCR :**

La conception des amorces est sans doute le paramètre le plus important pour le succès de la PCR. Toutes choses égales par ailleurs, une amorce mal conçue peut empêcher le fonctionnement de la réaction PCR. La séquence d'amorce détermine plusieurs choses, telles que la position et la longueur du produit, sa température de fusion et finalement le rendement (70). Une amorce mal conçue peut conduire à une production faible, voire nulle, en raison d'une amplification non spécifique et/ou à la formation de dimères d'amorce, qui peuvent devenir suffisamment compétitifs pour inhiber la formation du produit.

### **1.1. Sélection des amorces :**

Plusieurs variables doivent être prises en considération lors de la conception des amorces pour la PCR. Les plus importantes sont:

#### **1.1.1. La longueur de l'amorce :**

Comme la spécificité, la température et le temps d'hybridation dépendent en partie de la longueur de l'amorce, ce paramètre est essentiel pour le succès de la PCR. En général, les oligonucléotides entre 18 et 24 bases sont extrêmement spécifiques de la séquence, à condition que la température d'hybridation soit optimale. La longueur de l'amorce est également proportionnelle à l'efficacité de l'hybridation. En général, plus l'amorce est longue, moins l'hybridation est efficace.

#### **1.1.2. La température de fusion ( $T_f$ ) :**

Se situera alors entre 56 et 62 °C

#### **1.1.3. La spécificité :**

La spécificité de l'amorce dépend au moins partiellement de la longueur de l'amorce. Il est évident qu'il y a beaucoup plus d'oligonucléotides uniques à 24 paires de bases qu'à 15 paires de bases. Ceci dit, les amorces doivent être choisies de telle sorte qu'elles aient une séquence unique dans l'ADN matrice qui doit être amplifié. Une amorce conçue avec une séquence hautement répétitive conduira à une traînée lors de l'amplification d'ADN génomique. Toutefois, la même amorce peut donner une bande unique si un clone unique d'une bibliothèque génomique est amplifié. Comme l'ADN polymérase Taq est active dans une large gamme de températures, l'extension de l'amorce se produira aux basses températures

## Matériels et méthode

---

d'hybridation. Si la température est trop basse, un amorçage non spécifique peut se produire, qui peut être étendu par la polymérase s'il y a une homologie courte à l'extrémité 3'. En général, une température de fusion de 55–72 °C donne les meilleurs résultats (à noter que cela correspond à une longueur d'amorce de 18–24 bases avec la règle de Wallace).

### **1.1.4. Les séquences d'amorce complémentaires :**

Les amorces doivent être conçues absolument sans aucune homologie intra-amorce au-delà de 3 paires de bases. Si une amorce possède une telle région d'auto-homologie, des structures partiellement doubles brin en «épingles à cheveux» peuvent se former, qui perturberont l'hybridation avec la matrice. Un autre risque similaire est l'homologie inter-amorce. L'homologie partielle dans les régions centrales de deux amorces peut interférer avec l'hybridation. Si l'homologie se situe à l'extrémité 3' de l'une ou de l'autre amorce, la formation de dimères d'amorce se produira, ce qui, par compétition, empêchera le plus souvent la formation du produit désiré.

### **1.1.5. La teneur en G/C et suites polypyrimidine (T, C) ou polypurine (A, G) :**

Les amorces devraient être composées à 45-55 % de GC. La séquence d'amorce doit être choisie de telle sorte qu'il n'y ait aucune suite poly-G ou poly-C pouvant promouvoir une hybridation non spécifique. Les suites polyA et poly-T doivent également être évitées, car elles «respireront» et ouvriront des parties du complexe amorce-matrice. Cela peut réduire l'efficacité de l'amplification. Les suites polypyrimidine (T, C) et polypurine (A, G) devraient également être évitées. Idéalement, l'amorce présentera un mélange presque aléatoire de nucléotides, une teneur de 50 % en GC et une longueur d'environ 20 bases. La  $T_f$  se situera alors entre 56 et 62 °C (71).

### **1.1.6. La séquence à l'extrémité 3' :**

Il est établi que la position terminale 3' dans les amorces PCR est essentielle pour empêcher le mésamorçage. Le problème des homologies d'amorce se produisant dans ces régions a déjà été examiné. Une autre variable à considérer est l'inclusion d'un résidu G ou C à l'extrémité 3' des amorces. Ce «crampon GC» contribue à la fixation correcte à l'extrémité 3' en raison de la liaison hydrogène plus forte des résidus G/C. Cela contribue également à une plus grande efficacité de la réaction en réduisant au minimum la «respiration» qui pourrait se produire.



### 2. Recherche de la séquence de référence du gène CD36 :

La conception des amorces encadrant le SNP rs3211908 commence par la recherche de la séquence de référence du gène CD36, pour cela la base de donnée « Ensembl » est utilisé grâce au site «www.ensembl.org » comme montré dans la Figure 8.

```
AAATTTTATCATTTTATGTAACCACTTHTATCATTTTATGTAACCACTTATTAAATGACTGT  
AACATTTAGAATAACCCCTAGAAATCATTTGTTTATTATAGGTTTGTTCATGTCGCCCTCACCT  
CAACATAGTAAGAATAGTGCATCAAAATGCCCCATTTGGOTTAAATTATGACAGAGTGTGTAG  
AGTTTACATCATGTGAGOTTOTGATATGTATOTTOTTTTGTACAGCATCTAGCACTTATT  
TOTAGGCACCTTTACAAATTTTTAAGGCCAAATAATTAAATGAAAAATGTATTGACAGATGTAT  
TTCAAGTCATTTGAGTAACCACTGATTTGAGAAATGTGAAAGTGAATYATGATTTGTACAA  
YTTTKAAAAAATGAOTTTGTAAGAATGATTTTTCCCTACATRTATGTCAGTACAACAAT  
ACTGCASAYGRAGTTTATRAARTTTTTCAATRGAAAAKAKAACATAAGTAAAGTTGCCATA  
ATYGACACATATAAAGGTAAAAAGTAAATGATTTTGTGTAATGTGCAATGTATGTTACTAG  
GGTACTOTTAAGCAGGAATAGTATTCAATTAACATOTCATAGACATAGSYATCAACTR  
TAGAAYAGACCTGTTATAATTGAGOTOTGAAAACTOCTGTTTGTGTAGSTATTAACTOT  
TTAGTTGTGRTAACCTGTTGAGTTCAACCACTGTCATAGOTGOTGRSTATCAGTCCACTT  
TAAGGTTTGTTCACCTTTOTGCAACAGTTATGGTTGTGTTACATAAAATCCCCAAAGGGA  
CTATTTTTTTCATCTGTGTACTTHTCCAGCATTACASTATAATTATTOTTCATTTAGAT  
AACCATAAATGAAAAAGTAAAAAAAAACAAAAACACACTCACTGATTTGTATAGAT  
GAAAACTTTTTTTTTTAACTTTTTAAATYRAGCATATGCAATTCATATTCCAGTGGCATGA  
CCTAAATRTGTOTATAAAGATGAAAGOTTAATGAATCCAGGCCACTGTTTTCAATGACOTT  
CCCCCTGCAAAATAGTOTTAAATAATTTTTCCRTAKGATAACTCAGTTTTTTTAACTTTTAC  
CAATGCAAAAAATAGAATGAATATTTCAARTRGCACTTGTACAAATGTAATAACAAATGGGA  
AAATGAAGACTTTGCCAAMTTTTAAAGTGTAAATAACAAATCAGTTTTCTAAGGCCATTA  
TTTTCTTTTTTTTTTTOTAGOTCCAGCOTATTCACTAAAGAAATTTATMATTATCATAT  
ATGTAACOTAGGAAGAACCCTAATAAATATCAGRGGAAAGAGTTTTOTTYTCCATAAAAT  
TAACAAATGTGTGTTTGAOTAGTTTTTTTTGAAAAAGATTAAGTGTATCMHAAACAAAA  
GAGATGAATGTTTTTATTAAATAAAGTAAACCCCTACTTCAAACTGAGTCTATCTAATG  
ATTGTTTTTAAAGOTAAATATTACTAGTGGASTACTTTTTTTOTTAAGAGTCCACAGY  
TACATATTTTTATAGAAAAATCAGTAGAGGAAAAAACACTTCTAAGTATTCACTTAA
```



**Figure 8 :** la séquence de gène CD36 par le site ensembl

Sont représenté en noir les séquences non codante (intron), en rouge la séquence codante (exon) et en bleu les différents SNP répertoriés.

Pour retrouver la position du rs 3211908 nous avons configuré la séquence de telle sorte à rendre visible l'ensemble des SNP du gène CD36 ainsi que leur référence.

Cette séquence est copiée dans un document Word, et la séquence d'intérêt est encadrée, comme montré dans la figure 9 ; pour faciliter notre recherche des amorces encadrant le SNP rs3211908.



## Matériels et méthode

```
TGATTTTAACTCAATACTCATAGCTCTTTCTTTGGCTAATGCTTTAACTTTTGGATGTCT
AATTTTTATCATTTTAGTAACCACTTATTATCATTTTAGTAACCACTTATTAATGACTGT
AACATTTAGAATACCCCTAGAAATCATTGTTCTTATAGGTTTGTTC AATGTCCCTCACCT
CAACATAGTAAGAATAGTGATCAAAATGCCCTCATTGGCTTAATTATGACAGAGTGCTAG
AGTTCACATCATGTCAGCTTCTGATATGTATCTTCTTTGTCACAGCATCTAGCACTTATT
TCTAGGCACCTTTACAATTTTTAAGGCCAATAATTTAAAAAATGTATTGCAGATGTAT
TTCAAGTCATTTGAGTAACCAGTGATTGAGAAATGTGAAAGTGAGTTATGTATTGTACAA
CTTTGAAAAAATGACTTGTAGAAGTAACATTTTCCCATACATATATTTTCAGTACAACAAT
ACTGCAGATGGAGTTTATAAAGTTTTCAATGGAAAAGATAACATAAGTAAAGTTGCCATA Exon17
ATCGACACATATAAAGGTAAGGTAAGTATTCTGGTAAAATGTGCATGTATGTTACTAG
GGTACTCTTAAGCAGGAATAGTATTCAATTAACATCTCATAAGACATAGGCATCAACCTA
TAGAACAGACCTGGTTATAATTCAGCTCTGGAAACTCCTGTTCTGCTAGGTATTAACCTC C rs3211908
TTAGTTGTGGTAACTGGTGAGTTCACACCAGTGCATAGCTGCTGACTATCAGCTCCACTT
TAAGGTTTGGTTCACCTTTCTGCACAGGTTATGGTTGTGTTACATAAAATCCCCAAAGGGA
CTATTTTTTCATCTCTGCTACTTATCCAGCATTACAGTATAATTATTCTTACAATTAGAT intron 18
AACCATAAATGAAAAGGTAAAAAAAAAAAAAAAAAACAACACATCAACTGATTGTGTAGTAGAT
GGAAACTTTTTTTTTTACTTTTTTAAATCGAGCATATCGAATTCATATTCCAGTGGCATGA
```

Figure9 : séquence de la région encadrant le SNP rs 3211908

**C** : rs3211908 en rouge l'exon17

### 3. Le design des Primers :

Dans les ressources du National Center for Biotechnology Information (NCBI) nous avons utilisé le logiciel Primer blast (Basic Local Alignment Search Tool) (72) dans le site « www.ncbi.nlm.nih.gov » afin de concevoir les amorces recherchées.

Primer-BLAST: A tool for finding specific primers

BI/ Primer-BLAST: Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST). [More...](#) [Tips for finding specific primers](#)

Reset page Save search parameters Retrieve recent results

PCR Template

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred) Clear

Forward primer Reverse primer

Or, upload FASTA file Parcourir...

Coller la séquence d'intérêt Clear

Figure 10 : L'outil primer blast

### 4. Analyse des Résultats du Primer Blast :

Le couple d'amorces choisi doit répondre aux critères suivant :

## Matériels et méthode

---

- Choisir le couple d'amorces qui donne le moins de produits aspécifiques, afin d'amplifier que le produit étudié
- Les températures d'hybridation des deux amorces doivent être le plus proches possibles, car la température d'hybridation lors d'une PCR
- La teneur en GC doit être proche de 40%
- Ignorer les produits aspécifiques de plus de 1000 pb, car lors d'une PCR il est moins probable d'amplifier une séquence de plus de 1000 pb

# Résultats

1. Résultat de la conception des amorces :

Dans un premier temps les cinq couples d'amorces donné par le site primer blast, présentait chacune un produit aspécifique de 200 à 800 pb donc nous ne pouvons pas prendre ce résultat en considération.

Nous avons par la suite, élargie la séquence à amplifié, malgré cela le résultat d'amplification du couple d'amorce (Figure 11) donne en plus de notre produit spécifique 515paires de bases (pb) un autre produit aspécifique de 961pb qui peut facilement être visible sur gel d'agarose.

**Primer pair 4**

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length
Forward primer	TCAAGTCATTTGAGTAACCA	Plus	20
Reverse primer	TGTAATGCTGGATAAGTAGC	Minus	20
Product length	515		

**Products on potentially unintended templates**

>[NT\\_007933.15](#) Homo sapiens chromosome 7 genomic contig. GRCh37.p10 Primary Assembly  
product length = 515

Features associated with this product:

[platelet glycoprotein 4](#)

[platelet glycoprotein 4](#)

Forward primer 1 TCAAGTCATTTGAGTAACCA 20  
Template 18326455 ..... 18326474

Reverse primer 1 TGTAATGCTGGATAAGTAGC 20  
Template 18326969 ..... 18326950

>[NT\\_009952.14](#) Homo sapiens chromosome 13 genomic contig. GRCh37.p10 Primary Assembly  
product length = 961

Features associated with this product:

[nitrate lyase subunit beta-like protein, mitochondrial pr...](#)

Forward primer 1 TCAAGTCATTTGAGTAACCA 20  
Template 13571121 C..G.....T...C.... 13571140

Figure 11 : 2eme résultat du couple d'amorce

Dans une troisième tentative, des amorces spécifiques à la région encadrant le SNP rs 3211908 ont été obtenues (Figure12) grâce au logiciel primer blast (72)

```

AATTTTTATCATTTTTAGTAACCACTTATTATCATTTTTAGTAACCACTTATTAATGACTGT
AACATTTAGAATACCCCTAGAAATCATTGTTCTTATAGGTTTGTTC AATGTCCCTCACCT
CAACATAGTAAGAATAGTGATCAAAATGCCCTCATTGGCTTAATTATGACAGAGTGCTAG
AGTTCACATCATGTCAGCTTCTGATATGTATCTTCTTT GTCACAGCATCTAGCACTTATT forward primer
TCTAGGCACCTTTTACAATTTTTAAGGCCAATAATTTAAAAAAATGTATTGCAGATGTAT
TTCAAGTCATTTGAGTAACCAGTGATTGAGAAATGTGAAAGTGAGTTATGTATTGTACAA
CTTTGAAAAAATGACTTGTAGAAGTAACATTTTTCCCATACATATATTTTCAGTACAACAAT
ACTGCAGATGGAGTTTATAAAGTTTTCAATGGAAAAGATAACATAAGTAAAGTTGCCATA exon17
ATCGACACATATAAAGGTA AAGGTAAGTATTTCTGGTAAAAATGTGCATGTATGTTACTAG
GGTACTCTTAAGCAGGAATAGTATTCATTTAACATCTCATAAGACATAGGCATCAACCTA
TAGAACAGACCTGGTTATAATTCAGCTCTGGAACTCCTGTTCTGCTAGGTATTAECTCT rs3211908
TTAGTTGTGGTAACTGGTGAGTTCACACCAGTGATAGCTGCTGACTATCAGCTCCACTT
TAAGGTTTGGTTCACCTTTCTGCACAGGTTATGGTTGTGTTACATAAAATCCCCAAAGGGA
CTATTTTTTTCATCTCTGCTACTTATCCAGCATTACAGTATAATTTATCTTACAATTAGAT intron 18
AACCATAAATGAAAAGGTAAAAA AAAAAAAAAA CAACACATCAACTGATTGTGTAGTAGAT reverse primer
GGAAACTTTTTTTTACTTTTTTAAATCGAGCATATCGAATTCATATTCAGTGCCATGA
CCTAAATGTGTCTATAAAGATGGAAGCTTAATGAATCCAGGCAACTGCTTTTCATGACCTT
CCCCCTGCAATAGTCTTTAATAATTTCCATATTGATAACTCAGCTTTTTTAACTTTAT

```

Figure12 : les couples d’amorces encadre la séquence de SNP rs3211908

L’amorce gauche 5'-GTCACAGCATCTAGCACTTA- 3'

L’amorce droite 5'-ACAATCAGTTGATGTGTTG- 3'

Ces amorces donnent, après PCR, un produit de 673pb (figure13). Leur longueur est de 20 et 19pb et ont une teneur en GC de 45.00 et 36.84%, leur température d’hybridation est de 59.98 et 57.98 °C respectivement pour la Forward et la reverse primer.

### Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer	GTCACAGCATCTAGCACTTA	Plus	20	39	58	59.98	45.00
Reverse primer	ACAATCAGTTGATGTGTTG	Minus	19	711	693	57.98	36.84
Product length	673						

Figure13 : le couple d’amorce spécifique à la région encadrant le SNP rs 3211908

## 2. Confirmation des résultats

Nous avons soumis les séquences des amorces à une analyse de confirmation qui se fait par le site « <http://genome.ucsc.edu/> » (figure14).

### UCSC Genome Bioinformatics

Genomes - Blat - Tables - Gene Sorter - PCR - VisiGene - Session - FAQ - Help

**About the UCSC Genome Bioinformatics Site**

Welcome to the UCSC Genome Browser website. This site contains the reference genome assemblies for a large collection of genomes. It also provides portals to the [ENCODE](#) and [Neanderthal](#) projects.

We encourage you to explore these sequences with our tools. The [Genome Browser](#) shows genes and chromosomes, showing the work of annotators worldwide. The [Gene Sorter](#) shows expression, homology and other information on groups of genes that can be related in many ways. [Blat](#) quickly maps your sequence to the genome. The [Table Browser](#) provides convenient access to the underlying database. [VisiGene](#) lets you browse through a large collection of *in situ* mouse and frog images to examine expression patterns. [Genome Graphs](#) allows you to upload and display genome-wide data sets.

The UCSC Genome Browser is developed and maintained by the Genome Bioinformatics Group, a cross-departmental team within the Center for Biomolecular Science and Engineering (CBSE) at the University of California Santa Cruz (UCSC). If you have feedback or questions concerning the tools or data on this website, feel free to contact us on our [public mailing list](#).

**News**

To receive announcements of new genome assembly releases, new software features, updates and training seminars by email, subscribe to the [genome-announce](#) mailing list.

12 June 2013 - **Ferret Genome Browser Released**

A Genome Browser is now available for the Ferret (*Mustela putorius furo*) assembly released by the Ferret Genome Sequencing Consortium April 2011 (version MusPutFur1.0; UCSC version musFur1). Please note the [assembly construction details](#). For more information and statistics about this assembly, see the NCBI

News Archives

Figure 14 : Utilisation du site UCSC genome bioinformatics .

Les résultats de cette confirmation donne un produit de 673pb situé sur le chromosome 7 (figure15) donc se résulta nous confirme la fiabilité des amorces conçu.

Genomes Genome Browser Tools Mirrors Downloads My Data About Us Help

**UCSC In-Silico PCR**

```
>chr7:80293529-80294201 673bp GTCACAGCATCTAGCACTTA ACAATCAGTTGATGTGTTG
GTCACAGCATCTAGCACTTAtttctaggaaccttcacaatttttaaggc
caataatttaaaaaatgtatgagatgtatttcaagtcatttgagtaa
ccagtgattgagaaatgtgaaagtgtatgtattgtacaacttgaaa
aaatgactttagaagtaacattttccatatacatatatttcagtacaaca
atactgagatggagtttataaagttttcaatggaaaagataacataagt
aaagttgcaataatcgacacataataaaggtaaaaggtaagtattctggtt
aaatgtgcatgtatgttactagggtactcttaagcaggaatagttatcat
ttaacatctcataaagacataggaatcaacctatagaacagacotggttat
aattcagctctggaactcctgtctctgtaggtattaactcttttagttgt
ggtaactggtgagttcacaccagtgcatagctgctgactatcagttccac
tttfaagtttggttcacctctctgacaggttatggttgggtacataaaa
tccccaaagggaactatttttcatctctgctactatcccagcattacagt
ataattattttcaattagataaaccataaatgaaaaggtaaaaaaaaaa
aaaaCAACACATCAACTGATTGT
```

**Primer Melting Temperatures**

Forward: 51.4 C gtcacagcatctagcactta  
Reverse: 49.4 C acaatcagttgatgtggtt

The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration. The code to calculate the melting temp comes from [Primer3](#).

Figure 15 : Résultats du site UCSC In-Silico PCR

### 3. Perspectives :

L'objectif de ce travail est de concevoir, avec spécificité, le couple d'amorces encadrant le SNP rs 3211908 du gène CD36 associé à l'obésité dans la population européenne (4), afin d'étudier son implication dans l'obésité chez la population Algérienne ; lors d'études cas-témoins ultérieures qui se fait grâce à l'une des deux méthodes majeures (PCR-RFLP ou PCR-Séquençage).

#### 3.1. PCR-RFLP :

Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (de l'anglais Restriction Fragment Length Polymorphism, ou RFLP)

En utilisant une enzyme de restriction le génome d'un individu va être découpé en plusieurs parties dépendant du nombre de sites de restriction présents dans le génome de l'individu pour l'enzyme utilisée. Le nombre de ces sites et leurs positions diffèrent en fonction de l'individu. On a donc un polymorphisme de longueur des fragments de restriction, et l'on peut donc réaliser une empreinte génétique d'un individu grâce à cette méthode. Ainsi on pourra différencier deux individus. Lorsque deux individus homozygotes sont comparés après digestion de leur ADN par une enzyme donnée et hybridation avec une sonde donnée (Southern Blot), on observera des profils d'électrophorèse différents chaque fois que des sites de restriction différeront (73).

Les étapes de la technique de RFLP :

1) Extraction de l'ADN des différents géotypes à analyser

2) Digestion de l'ADN par un enzyme de restriction. On obtient alors des fragments d'ADN de longueurs différentes selon les individus. Cette différence de taille est due a une différence du nombre de site de restriction qui varie selon les individus ; l'ADN à analyser est alors couper en fragment plus ou moins long du au polymorphisme de longueur des fragments de restriction.

Les étapes qui suivent servent à visualiser les différents fragments d'ADN obtenus :





3) Les fragments de restriction sont séparés selon leur taille par une électrophorèse en gel d'agarose. L'ADN étant chargé négativement, il migre de la cathode vers l'anode. Les fragments les plus petits sont les plus rapides.

4) L'ADN est transféré sous forme dénaturée sur une membrane de nylon. La position relative des fragments d'ADN est préservée durant le transfert.

Méthode du Southern Blot :

La membrane est incubée dans une solution contenant une sonde marquée préalablement, soit par la radioactivité, soit chimiquement. La sonde s'hybride alors avec le ou les fragments d'ADN avec lesquels elle présente une homologie. On utilise couramment deux sources de sondes, les sondes génomiques (ADNg) et les sondes d'ADN complémentaire (ADNc). Les sondes génomiques sont obtenues par digestion de l'ADN total du génome nucléaire de l'espèce étudiée à l'aide d'un enzyme de restriction. Les sondes d'ADNc correspondent nécessairement à des gènes exprimés, puisqu'elles sont obtenues à partir des ARN messagers.

6) L'endroit, ou les endroits, où la sonde s'est fixée sont révélés en plaçant la membrane au contact d'un film sensible à la radioactivité, ou en réalisant une réaction enzymatique colorée spécifique.

Les applications de la technique de RFLP :

La construction de cartes de liaisons génétiques, avec leurs multiples intérêts : localisation de gènes majeurs, analyse de la recombinaison, cartographie des gènes (73) et génotypage d'un SNP.

### **3.2. La technique PCR-séquençage :**

Une amorce universelle est choisie, courte chaîne nucléotidique de 15 à 25 nucléotides, complémentaire de la séquence d'ADN connue à amplifier et située juste en amont de la zone à séquencer. Cette amorce est nécessaire à l'accrochage de l'ADN polymérase. Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer la succession de nucléotides composant l'ADN. La première phase est la synthèse d'ADN complémentaire au brin matrice par l'ADN polymérase (à partir de l'amorce), par l'ajout de désoxyribonucléotides : dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Ce qui est particulier, pour le séquençage, est l'utilisation de nucléotides légèrement différents,

les didésoxyribonucléotides ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Dans le milieu de réaction, les dNTP sont en grande quantité et les ddNTP en faible nombre. Lorsque l'ADN polymérase utilise un ddNTP au lieu d'un dNTP, la synthèse du brin s'arrête. L'incorporation aléatoire de ddNTP permet d'obtenir des fragments d'ADN de taille variable. Les ddNTP sont incorporés, marqués par 4 fluorochromes différents. Les fragments d'ADN obtenus sont de longueurs différentes ; le séquenceur sépare les fragments d'ADN selon leur taille par chromatographie. Les systèmes actuels détectent la fluorescence des 4 nucléotides à partir de la même colonne. Le résultat est présenté sous forme d'électrophorégramme. Ensuite, est effectué l'alignement, soit graphiquement, soit par texte, c'est-à-dire que les séquences écrites en ligne sont envoyées sur Internet et comparées à des séquences déposées dans des banques de données. On peut ainsi obtenir des BLAST, c'est-à-dire des comparaisons avec les séquences les plus proches et l'identification qui correspond, rendue avec un pourcentage d'homologie (74).

### 3.3. Etude cas-témoins ("case-control study") :

Les enquêtes cas-témoins consistent à comparer la fréquence d'exposition antérieure à un (ou plusieurs) facteur(s) de risque dans un groupe de « cas » atteints de la maladie étudiée, et dans un groupe de « témoins » indemnes de celle-ci. La mesure du facteur de risque est effectuée rétrospectivement. L'enquête cas / témoin s'adresse de préférence aux maladies rares (75).

**Conclusion :**

L'obésité en Algérie est un véritable fléau et sa fréquence ne fait qu'augmenter .L'obésité est définie comme une accumulation anormale ou excessive de graisses corporelles qui peut nuire à la santé de l'individu. Selon l'OMS, environ 53% des femmes et 36% des hommes en Algérie souffrent de surpoids ou sont obèses (76).

De nouvelles habitudes alimentaires, la sédentarité et l'hygiène de vie sont en cause dans la nouvelle tendance de la population à l'obésité. Illustre la proportion des Algériens à considérer l'embonpoint comme un signe d'aisance financière, de bonne santé et surtout de bien-être. Pourtant, la surcharge pondérale induit des maladies graves, à l'instar de l'hypertension artérielle, le diabète, les accidents cardiovasculaires et les infarctus du myocarde (77).

Il est important, donc de trouver des causes moléculaires en Algérie cela se fait par une étude d'association. En effet le rs3211908 a été associé chez la population européenne à l'obésité.

Le couple d'amorces conçue au cours de ce travail servira à étudier l'implication du rs 3211908 dans l'obésité chez la population Algérienne ; lors d'études ultérieurs cas-témoin.

# Références Bibliographiques

## Références bibliographiques

---

- 1) Silverstein RL, Febbraio M. (2009). CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal.* 2009; 2:re3.
- 2) Su X, Abumrad NA. (2009). Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction. *Trends Endocrinol Metab.* 2009; 20:72–77.
- 3) Collot-Teixeira S, Martin J, McDermott-Roe C, et al. CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2007; 75:468–477.
- 4) Bokor S, Legry V, Meirhaeghe A, et al. (2010). Polymorphisme simple nucléotide de CD36 lieu et l'obésité chez les adolescents européens obésité (Silver Spring) 2010; 18. : 1398-1403 Cette étude suggère CD36 SNP associer à des mesures de l'obésité dans une population européenne.
- 5) Isabelle Borde. (2006). LA PCR Polymerase chain reaction ou réaction de polymérisation en chaîne . *Biologie et Multimédia - Université Pierre et Marie Curie - UFR de Biologie.* 23 mars 2006.
- 6) He a, Q., Marjamäki, M. Soini, H., Mertsola, J., ET Viljanen, MK. (1994). Amorces sont déterminantes pour la sensibilité de la PCR. *Biotechnologies.* 17: 82-87.
- 7) Dieffenbach, CW, Lowe, ATM, ET Dveksler, GS. (1993). Concepts généraux de conception d'amorces de PCR. Dans: *Méthodes PCR ET Applications*, froide Spring Harbor Laboratory 3: S30-S37.
- 8) Adms J, Marpuy P.(2000) .obesity in anasthessia and intensive care braneath 86 :91-108.advenced oxidation protein prodection in cbese women : its relation to insulinresistance and resistin *Clin Exp Med* .7(4) :173-178.
- 9) Garrow JS. (1988).Obesity and related diseases. Londres (Royaume-Uni), Churchill Livingstone, 1988:1–16.
- 10) Sorensen TI. (1995). the genetics of obesity. *Metabolism.* 1995; 44:4-6.
- 11) OMS Organisation mondiale de la Santé. (2003). Obésité: prévention ET prise en charge de l'épidémie mondiale. *In Série deRapports techniques.* OMS, Genève.
- 12) P. Tounian, Collège des Enseignants de Nutrition. (2011). Item 267: Obésité de l'adulte. *Université Médicale Virtuelle Francophone* 13.
- 13) M.Atek, y. laid, n. mezimeche.l. boutekdjiret, h. lebcir. (2010). L'Obésité chez l'adulte de 35 à 70 ans en Algérie, Transition épidémiologique et système de santé Projet TAHINA(Contrat n° ICA3-CT-2002-10011) , Septembre 2010.
- 14) Farooqi IS, O'Rahilly S. (2004). Monogenic human obesity syndromes. *Recent Prog.Horm.Res.*2004; 59:409-24:409-24.

## Références bibliographiques

---

- 15) Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC et al. (2005) .The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity*.(Silver.Spring). 2006; 14:529-644.
- 16) Bell CG, Walley AJ, Froguel P.(2005). The genetics of human obesity. *Nat.Rev Genet*. 2005; 6:221-34.
- 17) Farooqi IS, O'Rahilly S. (2005). Monogenic obesity in humans. *Annu.Rev Med*. 2005;56:443-58.:443-58.
- 18) Tandon, NN, Kralisz, U & Jamieson, GA. (1989a). Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion. *J Biol Chem*, **264**, 7576-7583.
- 19) Tandon, NN, Lipsky, RH, Burgess, WH & Jamieson, GA. (1989b). Isolation and characterization of platelet glycoprotein IV (CD36). *J Biol Chem*, **264**, 7570-7575.
- 20) Endemann, G, Stanton, LW, Madden, KS, Bryant, CM, White, RT & Protter, AA. (1993). CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem*, **268**, 11811-11816.
- 21) Abumrad, NA, el-Maghrabi, MR, Amri, EZ, Lopez, E & Grimaldi, PA. (1993). Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J Biol Chem*, **268**, 17665-17668.
- 22) Febbraio, M & Silverstein, RL. (2007). CD36: implications in cardiovascular disease. *Int J Biochem Cell Biol*, **39**, 2012-2030.
  
- 23) Laurent Daviet, John L. McGregor, (1997). Le CD36, UN récepteur multifonctionnel. *Hématologie*. Ed.132-7, vol.3, Mars - Avril 1997.
- 24) Collot-Teixeira, S, Martin, J, McDermott-Roe, C, Poston, R & McGregor, JL. (2007). CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*, **75**, 468-477.
- 25) Rac, ME, Safranow, K & Poncyljusz, W. (2007). Molecular basis of human CD36 gene mutations. *Mol Med*, **13**, 288-296.
- 26) Tao N, Wagner SJ & Lublin DM. (1996). CD36 is palmitoylated on both N- and C-terminal cytoplasmic tails. *J Biol Chem* **271**, 22315-22320.
- 27) Lisanti MP, Scherer PE, Vidugiriene J, Tang Z, Hermanowski-Vosatka A, Tu YH, Cook RF & Sargiacomo M. (1994). Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol* **126**, 111-126.

## Références bibliographiques

---

- Cell Immunol, **156**, 191-211.
- 39) Tontonoz, P & Nagy, L. (1999). Regulation of macrophage gene expression by peroxisome-proliferator-activated receptor gamma: implications for cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*, **10**, 485-490.
- 40) Tontonoz, P, Nagy, L, Alvarez, JG, Thomazy, VA & Evans, RM. (1998). PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*, **93**, 241-252.
- 41) Luiken, JJ, Dyck, DJ, Han, XX, Tandon, NN, Arumugam, Y, Glatz, JF & Bonen, A. (2002). Insulin induces the translocation of the fatty acid transporter FAT/CD36 to the plasma membrane. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **282**, E491-E495.
- 42) Muller, H, Deckers, K & Eckel, J. (2002). The fatty acid translocase (FAT)/CD36 and the glucose transporter GLUT4 are localized in different cellular compartments in rat cardiac muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, **293**, 665-669.
- 43) Nassir, F, Wilson, B, Han, X, Gross, RW & Abumrad, NA. (2007). CD36 is important for fatty acid and cholesterol uptake by the proximal but not distal intestine. *J Biol Chem*, **282**, 19493-19501.
- 44) Chen, M, Yang, Y, Braunstein, E, Georgeson, KE & Harmon, CM. (2001a). Gut expression and regulation of FAT/CD36: possible role in fatty acid transport in rat enterocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **281**, E916-E923.
- 45) Febbraio, M, Hajjar, DP & Silverstein, RL. (2001). CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest*, **108**, 785-791.
- 46) Luiken, JJ, Coort, SL, Willems, J, Coumans, WA, Bonen, A, Van Der Vusse, GJ & Glatz, JF. (2003). Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling. *Diabetes*, **52**, 1627-1634.
- 47) Jeppesen, J, Albers, PH, Rose, AJ, Birk, JB, Schjerling, P, Dzamko, N, Steinberg, GR & Kiens, B. (2011). Contraction-induced skeletal muscle FAT/CD36 trafficking and FA uptake is AMPK independent. *J Lipid Res*, **52**, 699-711.

## Références bibliographiques

---

- 48) Van Oort, MM, van Doorn, JM, Bonen, A, Glatz, JF, Van der Horst, DJ, Rodenburg, KW & Luiken, JJ. (2008). Insulin-induced translocation of CD36 to the plasma membrane is reversible and shows similarity to that of GLUT4. *Biochim Biophys Acta*, **1781**, 61-71.
- 49) Bonen, A, Parolin, ML, Steinberg, GR, Calles-Escandon, J, Tandon, NN, Glatz, JF, Luiken, JJ, Heigenhauser, GJ & Dyck, DJ. (2004). Triacylglycerol accumulation in human obesity and type 2 diabetes is associated with increased rates of skeletal muscle fatty acid transport and increased sarcolemmal FAT/CD36. *FASEB J*, **18**, 1144-1146.
- 50) Coort, SL, Luiken, JJ, Van Der Vusse, GJ, Bonen, A & Glatz, JF. (2004). Increased FAT (fatty acid translocase)/CD36-mediated long-chain fatty acid uptake in cardiac myocytes from obese Zucker rats. *Biochem Soc Trans*, **32**, 83-85.
- 51) Kuda, Jenkins CM, Skinner JR, la Lune SH, Su X, brut RW, Abumrad NA. (2011). "CD36 protéine est impliquée dans le flux de calcium Store-exploité, la phospholipase A2 activation, et la production de prostaglandine E2" . *J Biol Chem* 286 (20): 17785-17795.
- 52) Kashiwagi H, Tomiyama Y, Honda S, Kosugi S, Shiraga M, Nagao N, Sekiguchi S, Kanayama Y, Kurata Y, Matsuzawa Y. (1995) .Molecular basis of CD36 deficiency & Evidence that a 478C \* T substitution (proline90 \* serine) in CD36 cDNA accounts for CD36 deficiency. *J Clin Invest* 1995; 95: 1040-6.
- 53) Lepretre F, Vasseur F, Vaxillaire M, et al. (2004). ACD36 nonsense mutation associated with insulin resistance and familial type 2 diabetes. *Hum. Mutat.* 24:104 10.
- 54) Aitman TJ, Cooper LD, Norsworthy PJ, et al. (2000). Malaria susceptibility and CD36 mutation. *Nature* 405:1015–6.
- 55) Kashiwagi H, Tomiyama Y, Kosugi S, et al. (1994) Identification of molecular defects in a subject with type I CD36 deficiency. *Blood* 83:3545–52
- 56) Kashiwagi H, Tomiyama Y, Nozaki S, et al. (2001). Analyses of genetic abnormalities in type I CD36 deficiency in Japan: identification and cell biological



## Références bibliographiques

---

- characterization of two novel mutations that cause CD36 deficiency in man. *Hum. Genet.*108:459–66.
- 57) Tanaka T, Nakata T, Oka T, et al. (2001) .Defect in human myocardial long-chain fatty acid uptake is caused by FAT/CD36 mutations. *J. Lipid. Res.*42:751–9.
- 58) Kashiwagi H, Tomiyama Y, Nozaki S, et al. (1996) .A single nucleotide insertion in codon 317of the CD36 gene leads to CD36 deficiency. *Arterioscler.Thromb. Vasc. Biol.* 16:1026–32.
- 59) Curtis BR, Ali S, Glazier AM, Ebert DD, Aitman TJ, Aster RH. (2002). Isoimmunization against CD36 (glycoprotein IV): description of four cases of neonatal isoimmune thrombocytopenia and brief review of the literature. *Transfusion* 42:1173–9.
- 60) Omi K, Ohashi J, Patarapotikul J, Hananantachai H, Naka I, Looareesuwan S, Tokunaga K. (2003). CD36 polymorphism is associated with protection from cerebral malaria. *Am. J. Hum. Genet.*72:364–74.
- 61) Lipsky RH, Ikeda H, Medved ES. (1994). A dinucleotide repeat in the third intron of CD36. *Hum.Mol. Genet.* 3:217.
- 62) Yanai, H., Chiba, H., Fujiwara, H., Morimoto, M., Abe, K., Yoshida, S., Takahashi, Y., Fuda, H., Hui, S.P., Akita, H., Kobayashi, K. and Matsuno, K. (2000) .Phenotype-genotype correlation in CD36 deficiency types I and II. *Thromb Haemost*, 84 (3): 436-41.
- 63) PNRA PROGRAMME NATIONAL DE RECHERCHE EN ALIMENTATION (SensoFAT (un projet de recherche)).(2011).Rôle du fatty acid transporter FAT/CD36 dans la detection des lipids aux niveaux lingual, Intestinal et cérébral: impact sur le comportement alimentaire et la santé. octobre 2011.
- 64) Laugerette F, Passilly-Degrace P, Patris B, Niot I, Montmayeur JP & Besnard P. (2006). [CD36, a major landmark on the trail of the taste of fat]. *Med Sci (Paris)* 22,357-359.
- 65) Khan NA, Gaillard D, El-Yassimi A, Passilly-Degrace P, Hichami A & Besnard P. (2008). [Unraveling the downstream signalling of gustatory perception of lipids]. *Med Sci (Paris)* 24,692-693.

## Références bibliographiques

---

- 66) Drover VA, Ajmal M, Nassir F, et al. (2005). CD36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance of chylomicrons from the blood. *J Clin Invest* 2005 ; 115 : 1290-7.
- 67) Masuda D, Hirano K, Oku H, et al. (2009). Chylomicron remnants are increased in the postprandial state in CD36 deficiency. *J Lipid Res* 2009 ; 50 : 999-1011.
- 68) Ifremer. (2009). Principe de l'amplification par PCR. Fiche réalisée pour Bibliomer <http://www.bibliomer.com/> ET le centre de veille des produits aquatiques <http://veilleproduitsaquatiques.com/>- Décembre 2009.
- 69) Elise Jeannesson. (2008). analyse génomique et transcriptomique d'abcb1 en physiopathologie cardiovasculaire. inserm « génétique cardiovasculaire – cic 9501 » université henri poincaré – nancy i.
- 70) Innis, M.A., and Gelfand, D.H. (1994). Optimization of PCRs. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J. (Eds.) *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. London: CRC Press, pp. 5–11.
- 71) Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M.J. and Dveksler, G.S. (1995). General Concepts for PCR Primer Design. In: Dieffenbach, C.W, and Dveksler, G.S. (Eds.) *PCR Primer: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, pp. 133–155.
- 72) Altschul, F.; Vyas, V.; Cornfield, A.; Goodin, S.; Ravikumar, T.S.; Rubin, E.H.; Gupta, E. (1997). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1997, 215, 403–410.
- 73) Botstein et Coll. (1980). la technique de polymorphisme de longueur des fragments de restriction RFLP.
- 74) Carole Emile. (2010). PCR et séquençage du gène ARN 16S : applications en Bactériologie. *Biomnis Paris.focus* .18.
- 75) José labarere. (2005). Interprétation d'une enquête épidémiologique : type d'enquête, notion de biais, causalité (72). *Corpus Médical – Faculté de Médecine de Grenoble*.
- 76) El watan. (2013). L'obésité, un fléau qui touche les jeunes Algériens. *Journal du* 24/06/2013.

## Références bibliographiques

---

77) Zoom-algerie.com . (2007). L'obésité gagne du terrain en Algérie Actualité – Santé.



# Résumé

## Résumé :

**Introduction :** L'obésité est un problème majeur de santé qui peut contribuer au risque de complications métaboliques. Des études génétiques récentes suggèrent que CD36 joue un rôle important dans le métabolisme des lipides chez l'homme et peuvent être impliqués dans les complications liées à l'obésité.

La protéine CD36 est un récepteur scavenger de classe B. Le CD36 est une glycoprotéine de 472 acides aminés. Le gène CD36 est localisé sur le chromosome 7q11.2 chez l'Homme.

La protéine est exprimée de manière ubiquitaire sur une variété de types de cellules, y compris les adipocytes, les macrophages, les cellules endothéliales vasculaires et les entérocytes intestinaux.

**Objectif :** L'objectif de ce travail est de concevoir, avec spécificité, le couple d'amorce encadrant le SNP rs3211908 du gène CD36 associé à l'obésité dans la population européenne. Afin d'étudier son implication dans l'obésité chez la population Algérienne ; lors d'études cas-témoins ultérieures qui ce fait grâce à la PCR. La réaction PCR (Polymerase Chain Réaction) permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier.

**Matériels et méthode :** L'efficacité et la sensibilité de la PCR dépendent en grande partie sur l'efficacité des amorces. Grâce au logiciel primer blast nous avons conçu un couple d'amorce spécifique à la région encadrant le SNP rs 3211908.

**Résultats :** Un couple d'amorces spécifiques a été choisi donnant un seul produit spécifique d'amplification de 673 pb contenant le SNP rs3211908 du gène CD36.

**Mots clés :** Obésité, Gène CD36, Amorces, rs3211908, Produit spécifique.

## Summary:

**Introduction:** Obesity is a major health problem that may contribute to the risk of metabolic complications. Recent genetic studies suggest that CD36 plays an important role in lipid metabolism in humans and may be involved in the complications of the obesity.

The CD36 is a scavenger receptor class B. CD36 is a glycoprotein of 472 amino acids. The CD36 gene is located on chromosome 7q11.2 in humans.

The protein is ubiquitously expressed on a variety of cell types including adipocytes, macrophages, vascular endothelial cells and intestinal enterocytes.

**Objective:** The objective of this work is to design, with specificity, the primer flanking the SNP rs3211908 in the CD36 gene associated with obesity in the European population. To study its involvement in obesity in the Algerian population during subsequent case-control study is being done by PCR. The PCR (Polymerase Chain Reaction) amplifies a specific region *in vitro* nucleic acid given in order to obtain a sufficient quantity to detect and study.

**Materials and Methods:** The efficacy and sensitivity of PCR depend largely on the effectiveness of primers. With software primer blast we designed a couple of specific primer to the region flanking the SNP rs 3211908.

**Results:** A pair of specific primers was chosen giving a single specific amplification product 673 bp containing the SNP rs3211908 in the CD36 gene.

**Keywords:** Obesity, Gene CD36, Primers, rs3211908, specific product

## ملخص:

**مقدمة:** السمنة هي مشكلة صحية كبيرة يمكن أن تساهم في خطر حدوث مضاعفات الأيض. تشير الدراسات الجينية الحديثة أن CD36 يلعب دورا هاما في التمثيل الغذائي للدهون عند البشر ويمكن أن يشارك في مضاعفات السمنة.

البروتين CD36 هو مستقبل من مستقبلات فئة B CD36 هو بروتين سكري يتكون من 472 من الأحماض الأمينية. ويقع هذا الجين على الكروموسوم 7q11.2 في البشر.

يتم التعبير عن بروتين يتواجد مطلق على مجموعة متنوعة من أنواع الخلايا بما في ذلك الخلايا الشحمية، الضامة، والخلايا البطانية الوعائية والمعوية.

**الهدف:** الهدف من هذا العمل هو تصميم، مع خصوصية، التمهيدي المرافقة SNP rs3211908 في جين CD36 المرتبطة بالسمنة في لسكان أوروبا. يجري القيام بهذا لدراسة مشاركتها في البدانة في سكان الجزائر خلال دراسة الحالات والشواهد اللاحقة بواسطة PCR. و PCR (تفاعل البلمرة المتسلسل) يضخم منطقة محددة في الحمض النووي في المختبر من أجل الحصول على كمية كافية لكشف ودراسة

**المواد والطرق:** إن فعالية وحساسية PCR تعتمد إلى حد كبير على فعالية الأشغال مع البرمجيات blast primer قمنا بتصميم بضع التمهيدي محددة إلى منطقة المرافقة SNP rs.3211908

**النتائج:** تم اختيار زوج من بادلت محددة إعطاء منتج التضخيم واحدة محددة 673pb تحتوي على SNP rs3211908 في الجينات CD36.

**كلمات البحث:** السمنة، جين CD36، Amorces، rs3211908، منتج معين.

