



République Algérienne Démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique



UNIVERSITE DE TLEMCEM – ABOU-BEKR BELKAID

**FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE, ET DES SCIENCES DE LA TERRE ET
D'UNIVERS DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE**

Laboratoire de biologie moléculaire appliquée et immunologie



Mémoire

Présenté pour obtenir le grade
DE DIPLOME DE MASTER EN BIOLOGIE

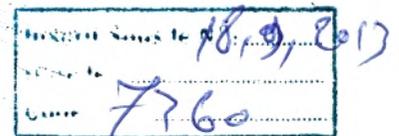
Option : Alimentation-Nutrition

Par

Touati Soumia

Soutenu le 03 _ 07 _ 2013

Intitulé :



**Conception des amorces encadrant le SNP rs6232
du gène PCSK1 associé à l'obésité**

JURY :

Dr. HADDOUCHE Mustapha

Dr. ARIBI Mourad

M^{ème}. BRAHAMI Nabila

Maître de conférences B

Maître de Conférence A

Maître – assistant A

Président

Examineur

Promotrice

Année universitaire 2012-2013

Remerciements

Nous devons et nous déplacer nos dernières étapes de la vie universitaire de la pause et revenir aux années que nous avons passées dans la réadaptation université avec nos clients professeurs qui nous ont donné beaucoup tant efforts dans la construction de la génération de demain pour envoyer la nation de New

Avant que nous offrons à nos profonds remerciements et sa gratitude et d'amour pour ceux qui ont porté le message le plus sacré dans la vie
Pour ceux qui ont ouvert à nous à travers la science et la connaissance
Pour tous nos éminents professeurs .

Et aussi remercier tous ceux qui ont aidé à compléter cette étude et nous a donné l'aide qu'ils nous un coup de main et nous a fourni les informations nécessaires pour compléter cette recherche

3_6_1_Définition.....	P13
3_6_2_Choix des amorces de PCR	P13
.. 3_6_2_1_ La spécificité	P13
3_6_2_2_ Les Outils	P13..
3_6_2_3Recherche de bonnes amorces	P15
II Matérielles et méthodes.....	P17
III Résultats et perspectives.....	P22
CONCLUSION.....	P26
BIBLIOGRAPHIE.....	P27

LISTE DES FIGURES :

Figure 1 : Prévalence de l'obésité dans le monde (d'après l'OMS 2005)

Figure02 : Localisation du gène PCSK1 sur le chromosome 5 humain

Figure 03 : Représentation schématique des pro protéines convertases

Figure 04 : La technique d'amplification

Figure 05: la séquence de gène pcsk1 par le site ensemble

Figure6 : séquence de la région encadrant le snprs6232

Figure 7 : L'outil primer blast

Figure8 : Amorces spécifiques (en vert) encadrant le rs6232.

Figure9 : Résultat du Primer blast

Figur10 : Confirmation des Résultats par le site UCSC in sillico PCR

Liste des Tableaux :

**Tableau 1 : Classification des masses corporelles chez les adultes
(OMS, 2003; Santé Canada,2003)**

Tableau2 :Détermination de la prévalence sexe ;âge

**Tableau 3 : Tableau3 : Détermination de la prévalence de L'Obésité en Algérie selon le
sexe . âge**

Tableau4 : Liste des variantes identifiées dans le gènepcsk1 :

Tableau 5 : Exemples de cycles PCR en fonction des fragments :

LISTE DES ABREVIATIONS :

dNTPs	DésoxyNucléotides-Tri-Phosphates
IMC	indice de masse corporelle
LEP	leptine
LEPR	récepteur à la leptine
MC4R	récepteur 4 aux mélanocortines
OMS	organisation mondiale de la santé
PC	prohormone convertase
PC1/3/PCSK1	prohormone convertase 1
POMC	proopiomélanocortine
SNP	single nucleotide polymorphism



INTRODUCTION

INTRODUCTION :

L'obésité est reconnue comme un problème majeur de santé publique depuis 1997 (James et al.,2008). La gravité de l'obésité est évaluée par l'indice de masse corporelle (IMC), il correspond au poids divisé par le carré de la taille exprimé en kg/m². L'Organisation Mondiale de la Santé(OMS) a défini les seuils de maigreur, normalité, surpoids et obésité selon la capacité de travail, la sensibilité aux infections et les statistiques de mortalité.

Le nombre de gènes ou de loci impliqués dans le développement de l'obésité est estimé à environ 300(changnon et al. 2003) cependant, très peu d'entre eux ont montré une implication causale réelle dans la mise en place de cette pathologie. Il existe des formes rares, dites monogéniques, pour lesquelles l'obésité est le résultat d'une mutation au sein d'un gène donné. A ce jour, seulement 36 cas impliquant des mutations au sein de 6 gènes différents ont été recensés : gènes de la leptine (LEP, 6 cas), du récepteur de la leptine (LEPR, 3 cas), de la pro-opiomélanocortine (POMC, 2 cas) du récepteur aux mélanocortines de type 4 (MC4R, 73 cas) de la pro-hormone convertase-1 (PCSK1, 1 cas) (changnon et al 2003)

Le gène PCSK1 code pour la prohormoneconvertase 1/3 qui convertit des prohormonesinactives (dont la pro-insuline, proglucagon et proopiomélanocortine) en hormones peptidiques biologiquement actifs. Les mutations perte de fonction du gène *PCSK1* causent une obésité monogénique et une tolérance au glucose chez l'homme (Jackson et al 1997),(Jackson et al 2003),(Farooqi et al2007) ce qui implique que des variants communs dans le gène *PCSK1* pourraient prédisposer à l'obésité et le diabète de type 2 dans la population générale.

Récemment, les variants rs6232 (codant N221D) et rs6234-rs6235 (codant pour la paire Q665E-S690T) du gène *PCSK1* ont été montré pour être systématiquement associée à un risque d'obésité dans les populations européennes (Benzinou et a,2008)

Notre travail constitue une étape préliminaire à la recherche d'association du snp rs 6235 du gène *pcsk1* à l'obésité dans la population algérienne, cette étape est la conception d'amorces encadrant la variation qui serviront à amplifier la séquence d'oligonucléotides contenant le snp recherché lors d'une réaction de polymorphisme en chaîne ;

La PCR consiste à utiliser, de manière répétitive, l'une des propriétés des ADN polymérase : celle de ne pouvoir synthétiser un brin complémentaire d'ADN qu'à partir d'une amorce qui est une petite séquence d'ADN utilisée pour démarrer la répllication de l'ADN lors de la PCR.

INTRODUCTION

C'est donc une séquence complémentaire à une région située au début de l'ADN que l'on veut amplifier. Il faut bien choisir l'amorce pour que l'efficacité de la PCR soit optimale.

Objectif :

L'objectif de notre travail est de concevoir des amorces qui encadrent le SNP rs6235 de PCSK1 qui a été associée à l'obésité chez la population européenne pour que plus tard ce SNP fasse l'objet d'une étude cas-témoins pour voir l'association de ce SNP, à l'obésité, chez la population algérienne.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE :

1_L'obésité :

1_1_Définition :

Le terme obésité vient du grec « baros » qui veut dire « lourd et grand ». ». L'OMS fournit des critères précis pour définir l'obésité (Évolution de l'obésité au Québec et au Canada"VILLENCEUVE, Jocelyn -ASSTSAS - Objectif prévention, vol. 30, no 5, décembre 2007, p. 10-11)

L'obésité est déterminée par les interactions de facteurs de prédisposition, génétiques et environnementaux. De grands progrès ont été faits dans la compréhension de certains mécanismes moléculaires impliqués mais nous ne sommes pas encore capables d'analyser en détail ces interactions gènes/gènes-gènes/environnement contribuant au développement de cette maladie complexe. Le but de cette revue est de présenter quelques exemples d'études génétiques de l'obésité ainsi que les nouveaux outils en développement visant à étudier la contribution relative de nombreux gènes dans l'obésité et leurs réponses aux changements de l'environnement.

L'obésité se définit à l'aide des courbes d'IMC qui évoluent en fonction de l'âge et sont Lorsque l'IMC est supérieur à la courbe qui correspond à un IMC à 30 kg/m² (qui correspond au rapport du poids en kilogramme sur le carré de la taille en mètre (kg/m²).) chez l'adulte on parle d'obésité (définition internationale) ou obésité de degré 2. Le traçage de la courbe d'évolution

1_2_Diagnostic de l'obésité :

L'obésité correspond à un excès de masse grasse entraînant des conséquences néfastes pour la santé (OMS). 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. L'obésité est définie par un IMC \geq 30 kg/m², 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).

Synthèses bibliographiques

Tableau 1 : Classification des masses corporelles chez les adultes(OMS, 2003; Santé Canada,2003)

Classification	Catégorie de l'IMC (Kg/m ²)
Poids insuffisant	< 18,5
Poids normal	18,5 à 24,9
Surpoids ou pré-obésité	25,0 à 29,9
Obésité	30,0 à 34,9
Classe I (modérée)	35,0 à 39,9
Classe II (sévère)	40 et plus
Classe III (morbide)	

L'IMC est divisé en plusieurs classes et constitue un outil standardisé de recherche utilisé dans la plupart des études sur l'obésité. Ces classes définissent les individus avec un poids santé (18,5-24,9 kg/m²), une surcharge pondérale (25-29,9 kg/m²) et les individus obèses (>30 kg/m²), selon les standards acceptés et recommandés par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) chez les personnes âgées de plus de 18 ans Organisation mondiale de la Santé. Obésité : prévention et prise en charge de l'épidémie mondiale. Organisation mondiale de la Santé, série de rapports techniques n°894. Genève; 2000

1_3_Les conséquences de l'obésité sur la santé :

L'obésité est trop souvent considérée comme un mal esthétique, pourtant au delà se cache une maladie dont les conséquences peuvent s'avérer extrêmement sérieuses pour la santé. Plus la surcharge pondérale est importante, plus les risques cardiovasculaires augmentent.

L'obésité favorise l'apparition de maladies cardiovasculaires dont des infarctus du myocarde ou encore des insuffisances cardiaques mais également d'autres maladies telles que l'hypertension, le diabète de type 2 ou encore l'apnée du sommeil. Ces conséquences de l'obésité sur la santé peuvent être graves, handicapantes pour les malades et pénibles dans leur prise en charge. L'obésité de l'enfant est par ailleurs associée à des décès prématurés et des incapacités à se mouvoir à l'âge adulte .Le monde médical se trouve parfois démuni face à l'obésité qui se trouve être un problème de santé publique récent.

1_4_ Prévalence de l'obésité :

1_4_1-Prévalence de l'obésité dans le monde :

L'obésité est devenue un problème de santé à l'échelle mondiale. Ces dernières années, la prévalence de l'obésité n'a cessé d'augmenter partout dans le monde touchant à la fois les pays développés et les pays en voie de développement. Plus récemment, les études sur le surpoids et l'obésité de l'enfant ont montré que l'épidémie atteignait un plateau dans les pays les plus développés (8-10) (Bessesen, D.H et al. 2000(Olds, et al 2010)

Aux Etats-Unis, les obèses représentent 33% de la population(Figure 1). En Europe, la prévalence varie de 4.0 à 28.3% chez les hommes et de 6.2 à 36.5%chez les femmes suivant les gradients Ouest/Est et Nord/Sud (Berghofe et al 2008)

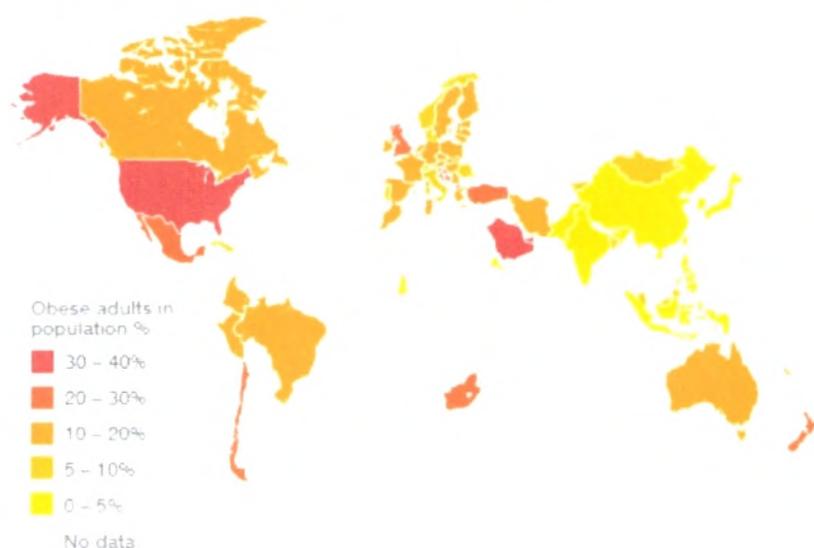


Figure 1 : Prévalence de l'obésité dans le monde (d'après l'OMS 2005)

1_4_2L'Obésité chez l'adulte de 35 à 70 ans en Algérie :

En Algérie, l'ampleur du problème en matière d'obésité n'est pas encore bien connue; cependant un certain nombre d'éléments laissent penser que la situation n'est guère différente de celle qui prévaut dans les pays de même niveau de développement.

1_4_3_ Analyse des caractéristiques de l'obésité total en Algérie :

1431Détermination de la prévalence :

1_4_3_1_1 selon le sexe :

La fréquence de l'obésité totale est de 21.24%. Elle est plus élevée chez les femmes que chez les hommes (30.08% vs 9.07%).

1_4_3_1_2 selon l'âge :

Globalement, la prévalence de l'obésité totale augmente significativement ($p=0.0049$) avec l'âge entre 35 et 59 ans (18.64 % à 23.33%) et chute dans la tranche 60-70 ans (18.72%).

Synthèses bibliographiques

Chez l'homme, la prévalence chute progressivement de 9.58% dans la tranche d'âge 35-39ans à 9.10% chez les 50-59 ans puis à 8.51% dans la tranche 60-70 ans (DNS p=0.95).

Chez la femme, la prévalence passe de 24.13% dans la tranche d'âge 35-39 ans à 33.89% chezles 50-59 ans puis chute à 28.55 % dans la tranche 60-70 ans (DS p=0.001).

Tableau3 :Détermination de la prévalence de L'Obésité en Algérie selon le sexe et l'âge

Age (année)	Masculin		Féminin		Total	
		Effe %		Effe %		Effe %
35-39 ans	425	9,58	490	24,13	915	18,64
40-49 ans	610	9,30	926	31,44	1536	22,93
50-59 ans	524	9,10	798	33,89	1322	23,22
60-70 ans	445	8,51	532	28,55	977	18,72

Chez l'homme, la prévalence n'est pas significativement plus importante (p=0.96) dans les plaines (15.64%) ou dans le sud (15.20%) ou dans le tell (15.19%).

Chez la femme, la prévalence est significativement plus importante (p=0.0009) dans la région des hautes plaines (55.42%) que dans le tell (51.62%) ou dans le sud (36.95%). Les différences observées entre urbain versus rural 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.(Analyse_obésité_algérie_02_09Administrateur*Septembre 2010*) p34

1_5 – Etiologie de la maladie :

L'obésité est une maladie complexe et multifactorielle. Cette maladie provient d'un déséquilibre chronique entre les apports et les dépenses énergétiques conduisant à une balance énergétique positive. Des facteurs environnementaux, épigénétiques et génétiques contribuent a' ce déséquilibre.

1_5_1–Facteurs environnementaux :

L'épidémie de l'obésité peut-être attribuée à de récents changements au sein de notre environnement. Un accès facile à une alimentation riche en énergie, combiné à une diminution de l'activité physique jouent sans aucun doute un rôle majeur dans l'augmentation de la prévalence de l'obésité mais d'autres facteurs environnementaux contribuant à l'épidémie de l'obésité ont été récemment proposés (48) 48. Mc Allister, *et al.* (2009) .. La

prise de poids peut-être associée aux effets secondaires de certains médicaments, notamment certains psychotropes (mais aussi contraceptifs, traitements d'immunodéficience) ou l'interaction complexe médicamenteuse. Des agents pharmaceutiques comme l'olanzapine (antipsychotique utilisé pour traiter la schizophrénie et d'autres troubles psychiatriques) peuvent induire l'adipogenèse *in vitro* (49-51). 49.(Minet-Ringuet, et al 2007) 51.(Yang, et al 2007)

1_5_2 Facteurs épigénétiques :

Une partie non négligeable de l'obésité pourrait être expliquée par des mécanismes épigénétiques. Le terme épigénétique se réfère à des mécanismes moléculaires (tels que la méthylation de l'ADN et la modification des histones) qui affectent l'expression des gènes sans modifier la séquence d'ADN primaire.

La nutrition est un signal environnemental externe directement lié à l'obésité, et peut induire des altérations épigénétiques qui affectent l'expression des gènes spécifiques impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique. La composition des aliments peut également influencer la méthylation de l'ADN car des molécules de petites tailles (tels que l'acide folique, vitamine B12, la méthionine et la choline) peuvent inverser l'activation ou l'inactivation épigénétique des gènes (80, 81). 80. Friso, et al 2002)81(. Friso et al.2005)

1_5_3–Facteurs génétiques :

Si les facteurs environnementaux et épigénétiques expliquent une partie de l'épidémie de l'obésité, les facteurs génétiques contribuent également aux variations inter-individuelles dans le risque de l'obésité (84). (Visscher et, al 2008).

Un petit nombre de gènes aurait un impact important sur la corpulence et le pourcentage ou la redistribution régionale de la masse grasse.

Les enfants en surpoids âgés d'une dizaine d'années ayant au moins un parent obèse ont un risque de 80 % de le devenir à leur tour à l'âge adulte contre 10 % de risque si les deux parents sont maigres.

Les approches génétiques peuvent par conséquent fournir un outil essentiel pour comprendre les mécanismes moléculaires et physiologiques complexes impliqués dans la régulation de la prise de poids (87).. (Farooqi, et al 2008)

2_Le gène PCSK1 :

2_1définition :

Le gène *PCSK1* (pro hormone convertase subtilisine / Kexin type 1) est impliqué dans la régulation de l'appétit et par conséquent de l'obésité par le biais des activités biochimiques de sa protéine (PC1 /3) sur les peptides clés dans la voie de la leptine-mélano cortine [4](Jackson et al,1998).Le gène *PCSK1* est composé de 16 exons, localisé sur le chromosome 5 humain (Figure2).

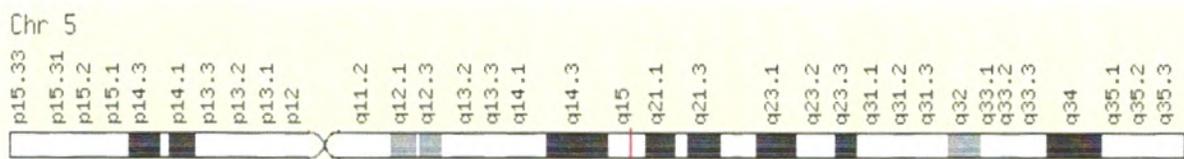


Figure02 : Localisation du gène PCSK1 sur le chromosome 5 humain

De rares variants du gène *PCSK1* provoquent un appauvrissement total ou partiel de la protéine PC1 / 3 ont été rapportés comme étant associés à l'obésité extrême(Creemersetal2011)(Farooqi et al 2007)(O'Rahilly et al 1995),(Jackson et al2003), (Jackson et al1997) .En outre, des variants communs de *PCSK1* (notamment rs6232 et rs6234-rs6235) contribuent au risque de l'obésité dans une étude sur 13.659 sujets européens (Benzinou et al2008). Ainsi, *PCSK1* est considéré comme facteur jouant un rôle dans ce trouble fréquent Renstrom F et al. 2009) (À Kilpelainen, et al 2009)(Sandholt CH et al.2010). (Rouskas K, et al 2011) (Sandholt et al2010). (Q Qi et al2010). À ce jour, plusieurs études sur l'association des variants de ce gène avec l'obésité ont été entreprises dans les populations européennes .(Renstrom F et al. 2009) (À Kilpelainen, et al 2009)(Sandholt CH et al.2010) . (Rouskas K, et al 2011) .

2_2_ La proteine PC1/3:

Le gène *PCSK1* fabrique une enzyme appelée proconvertase 1 qui rend opérationnels plusieurs hormones et peptides circulants essentiels à la vie et impliquées dans le contrôle de l'appétit comme l'insuline, le glucagon (et ses dérivés comme le GLP1, nouveau traitement du diabète de type 2) et laproopiomelanocortine (qui provoque la satiété). (Kilpelainen, et al 2009) La découverte des gènes causant des formes monogéniques d'obésité tels que le gène de

Synthèses bibliographiques

la PCSK1 a grandement amélioré notre compréhension de la physiopathologie de l'obésité . (Bell et al 2004).

Ce gène code pour une enzyme exprimée dans les cellules neuroendocrines qui convertissent les prohormones inactifs en des hormones fonctionnelles clés qui régulent l'énergie du métabolisme centrale et / ou périphérique.

La Proprotéineconvertase 1/3 (PC1 / 3) est une sérine endoprotéase impliquée dans l'activation protéolytique de la pro-hormone et proneuropeptides dans la voie de sécrétion des cellules endocrines et neuroendocrines (Seidah et al).

2_3-Structure des proprotéines convertases

Les PCs ont en commun la structure protéique composée d'un pro-peptide suivi d'un domaine catalytique, un domaine P et des domaines carboxy-terminaux (**Figure 4**)(Thomas et al2002)(Creemers et al2008).La plus forte homologie entre les PCs se trouve au niveau du domaine catalytique. Le prodomaine est essentiel pour la conformation, l'activation, le transport et la régulation de ces PCs. Le domaine P est indispensable pour l'activité enzymatique de ces PCs à l'exception dePCSK9 (Benjann et al2004)(Zhou et al1998). Les domaines carboxy-terminaux sont moins conservés entre les PCs.

Les motifs de séquences répétées jouent un rôle important dans le trafic intracellulaire (Thomas et al2002).. La structure de la protéine PC1/3 est donc composée d'un peptide signal, d'un pro-domaine, d'un domaine catalytique, d'un domaine P et enfin d'un domaine riche en Ser/Thr.

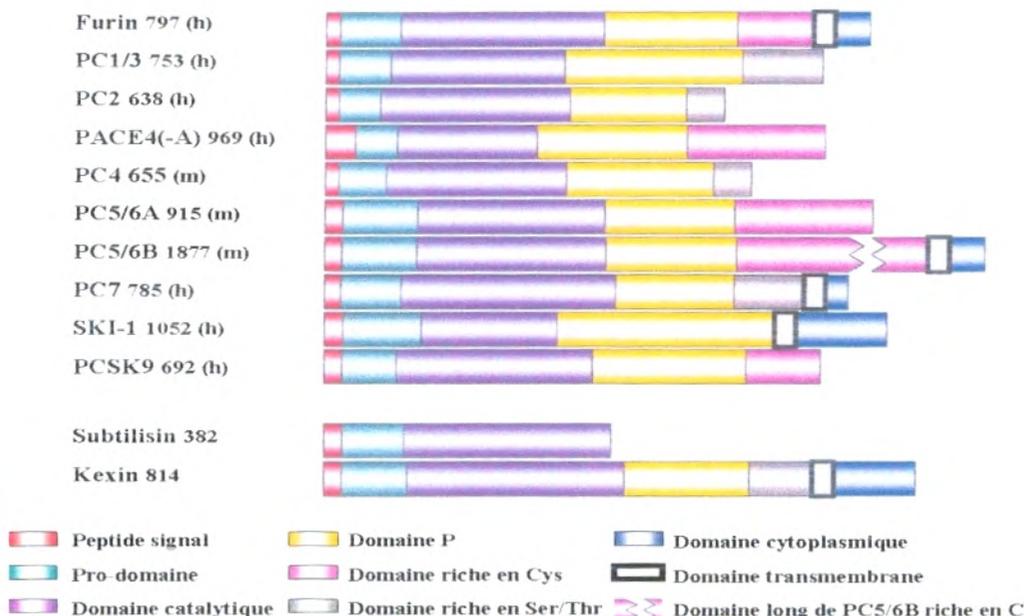


Figure 3 : Représentation schématique des proprotéines convertases

2_4- Rôles de PCSK1 :

Les rôles de PCSK1 sont connus et variés : PCSK1 mature un large éventail de substrats incluant la proinsuline, le proglucagon et les peptides dérivés de laproopiomélanocortine (POMC). Il est ainsi impliqué dans la voie très conservée de la leptinémélanocortine qui est essentielle pour la régulation de la prise alimentaire et de la prise du poids. La déficience complète en *PCSK1* chez l'humain a été associée à un syndrome multi hormonal caractérisé par une hyperphagie qui conduit à une apparition précoce d'obésité sévère, une homéostasie glucidique anormale, des troubles de la fonction intestinale, et une hypo adrénalisme.

2_5-Expression des proprotéines convertases :

Les PCs sont principalement exprimées dans le cerveau et dans les organes périphériques chaque PC possède une localisation subcellulaire distincte mais souvent partiellement chevauchante. Elles sont actives dans des compartiments intracellulaires variés et des voies de sécrétion (constitutives et régulées), la voie d'endocytose et à la surface cellulaire.

Il existe un seul transcrite ARNm de PC1/3. La PC1/3 est principalement exprimée dans le cerveau, les cellules enteroendocrines et le système neuroendocrine . (Taylor et al2003)

2_6_ Le gène PCSK1 et obésité monogénique et polygénique :

Le gène *PCSK1* était associé à des formes polygéniques, monogéniques graves mais très rares et des formes oligogéniques d'obésité dues à une déficience partielle en *PCSK1* mais cette fois beaucoup plus répandue (environ 1% des obèses). De ce fait, *PCSK1* est impliqué à la fois dans l'obésité monogénique et polygénique. La présence au sein d'un même gène de mutations pathogéniques causales d'obésité et de variants fréquents prédisposant à l'obésité montre qu'il existe un continuum entre les obésités monogénique et polygénique.

2_7_ les variants snp du gène PCSK1 associée a l'obésité:

Allèles mineurs de deux polymorphismes communs non synonymes de nucléotides simples (SNP), rs6232 (T> C, N221D) et rs6235 (C> G, S690T), ont été associés à un risque accru d'obésité dans la population européennes. La fréquence de l'allèle mineur du SNP rs6232 était de 0,01 chez les Autochtones et 0,08 chez les Caucasiens (P <4,10 (-6)); pour le SNP rs6234, il était de 0,20 et 0,32, respectivement (P <0,001). Reséquencement révélé que le SNP rs6234 variation a été étroitement liée à celle de la SNP rs6235, comme indiqué

Synthèses bibliographiques

précédemment. Le plus intéressant, tous les transporteurs de la variation SNP rs6232 également porté les rs6234 / rs6235 SNP

Bien rs6232 est rare dans la population mexicaine, elle devrait être considérée comme un facteur de risque important pour les formes extrêmes d'obésité (Villalobos- , *et al.* (2012).)

Tableau4 : Liste des variants identifiées dans le gènepsk1 :

<i>SNP description</i>	<i>dbSNP</i>	Chromosome	position	Gene	position(exon)
<i>K26E</i>		95,794,427		1	
<i>P40P</i>		95,794,383		1	
<i>L90 L</i>		95,790,688		2	
<i>M125I</i>		95,784,792		13	
<i>T175M</i>		95,787,30		4	
<i>N180 S</i>		95,784,792		4	
<i>Y181H</i>		95,784,777		4	
<i>N204N</i>	rs6231	95,784,775		5	
<i>N221D</i>	rs6232	95,783,348		6	
<i>G226R</i>		95,777,526		6	
<i>S325N</i>		95,772,355		8	
<i>N550N</i>	rs6233	95,758,868		12	
<i>T558A</i>		95,758,846		12	
<i>Q665E</i>	rs6234	95,754,730		14	
<i>S690T</i>		95,754,654		14	

3_ La PCR (Polymérase Chain Réaction) :

3_1_ Définition :

La PCR est une méthode enzymatique pour l'amplification exponentielle de fragments d'ADN spécifiques in vitro (Saiki et al., 1985). Étant donné que les produits amplifiés du cycle précédent servent de modèles pour le cycle suivant, l'amplification est un processus exponentiel et une technique très sensible pour détection de l'acide nucléique.

3_2_ Principe :

La technique PCR se base sur le principe suivant :

- Connaître d'abord les fragments (20 nucléotides) qui encadrent la séquence d'ADN à amplifier.
- Synthèse de séquences complémentaires à ces fragments : ce sont les amorces oligonucléotidiques.
- L'ADN polymérase commence la synthèse des brins complémentaires grâce aux amorces et le nombre de copies de la séquence d'ADN est doublé pour chaque réplication.

3_4_ Les étapes de PCR :

Etape 1 : Une fois tous les éléments rassemblés, l'ADN à amplifier est chauffé jusqu'à 90°C pendant 30 secondes à une minute pour séparer ses deux brins.

Etape 2 : Le tube est refroidi à environ 50°C (température calculée en fonction de la séquence des amorces). Cette température va permettre l'hybridation des deux brins d'ADN avec les deux amorces.

Etape 3 : Synthèse des brins complémentaires par la Taq polymérase.

Les trois étapes forment un cycle. La PCR se fait entre 30 et 40 cycles. (Figure 3)

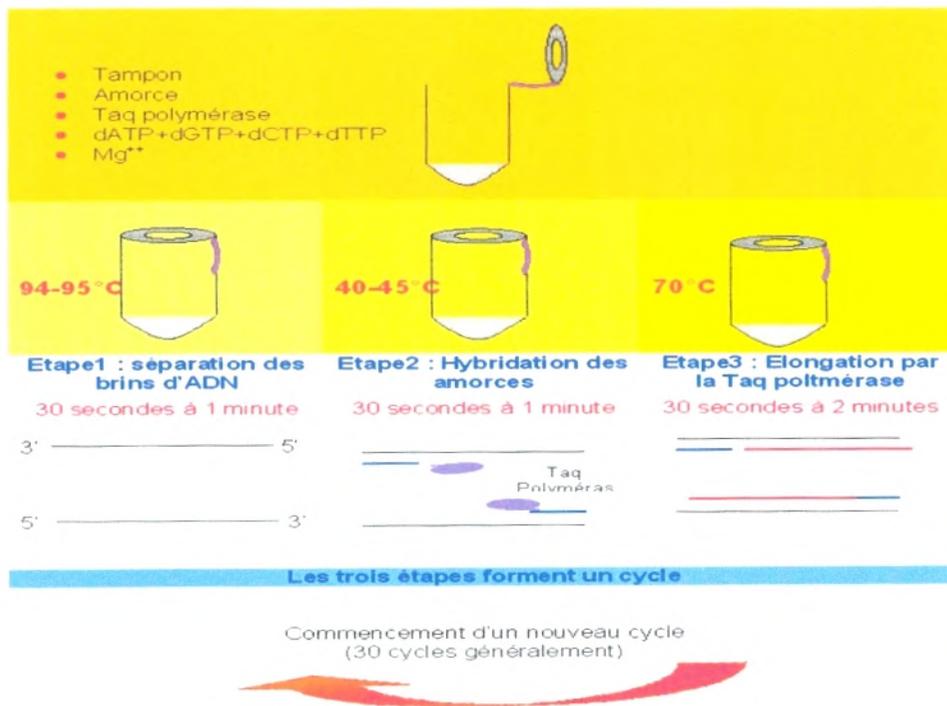


Figure 4 : La technique d'amplification PCR

Le nombre de copies de la séquence à amplifier dépend du nombre de cycles à réaliser.

Synthèses bibliographiques

Puisque à chaque cycle, le nombre de copies est multiplié par deux, on aura alors un nombre égal à 2^n après n cycles (**LA TECHNIQUE D'AMPLIFICATION *IN VITRO* PCR Alae**)
Concernant la troisième étape de chaque cycle, des durées de plusieurs minutes peuvent être nécessaires pour les fragments plus longs (2 à 3 Kb, ou les fragments de 3 à 40 Kb dans la longue PCR « ou long PCR ») : surtout les fragments riches en G et C. (Tableau5)

Tableau 5 : Exemples de cycles PCR en fonction des fragments :

Nombre de copies de la cible	Nombre de cycles
105	25a'30
104	30a'35
102 à 103	35a'40
1 à 102	40a'45

3_5_ Les acteurs de la PCR :

L'ADN : Généralement sous forme de double-brin, il contient le fragment à amplifier.

Deux amorces, sens et anti-sens : Ce sont de petits brins d'ADN d'environ 20 bases, (appelés oligo nucléotides) capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases, sur le brin d'ADN ou sur son brin complémentaire. Les amorces sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier.

Une enzyme : La Taq Polymerase (Taq Pol), une ADN polymérase thermorésistante extraite de la bactérie *Thermus aquaticus*. Sa température optimale d'action est de 72°C et elle est capable de résister à des passages successifs à 95°C, ce qui a rendu possible l'automatisation de la procédure.

Les Nucléotides : dGTP, dATP, dTTP, dCTP, appelés globalement dNTPs (DésoxyNucléotides-Tri-Phosphates), qui sont les éléments de base utilisés par la Taq Pol pour synthétiser les brins d'ADN complémentaires.

3_6_ Choix d'amorces :

3_6_1_Définition :

Les oligonucléotides initient le travail de la Taq polymérase. Leur T_m est de 5°C de moins que la température d'hybridation. Généralement, ce sont les valeurs comprises entre 55 et 70°C qui donnent de bons résultats avec des concentrations de 0,1 à 0,2 μM .

3_6_2_Choix des amorces de PCR :

3_6_2_1_ La spécificité :

On ne veut amplifier que notre ADN d'intérêt et pas un autre ADN. Cet aspect est fondamental, en particulier si on s'intéresse à une famille multigénique ou à un transcrit alternatif précis.

Même si notre échantillon d'ADN est un peu contaminé par de l'ADN étranger, on aimerait que l'amplification de ce dernier ne soit pas possible

On ne veut pas que nos amorces puissent s'auto-amplifier en formant des dimères d'amorces

3_6_2_2_ Les Outils :

Connaissance de la séquence et des séquences qui présentent des homologies. Connaissance du ou des transcrits étudiés. GenBank, BLAST, Ensembl, PubMed, Multalin,

Choix des primers sur deux exons différents séparés par un intron d'au moins 1-2 Kb. Ensembl, BLAST.

Etude des primers sous Primer Express (Primer Test Document) intron d'au moins 1-2 Kb. Ensembl, Entrez, BLAST Etude des primers sous Primer Express (Primer Test Document).

3_6_2_3 Recherche de bonnes amorces :



Une amorce (ou "oligo" ou encore "primer") est une petite séquence d'ADN utilisée pour démarrer la réplication de l'ADN lors de la PCR. C'est donc une séquence complémentaire à une région située au début de l'ADN que l'on veut amplifier. Il faut bien choisir l'amorce pour que l'efficacité de la PCR soit optimale. Plusieurs facteurs interviennent dans ce choix :

- la taille : la séquence doit être assez longue pour être suffisamment spécifique et ne se lier qu'à l'endroit voulu, mais assez courte pour que l'appariement se fasse rapidement et complètement. La taille optimale est de 18-22 bases.
- La température de fusion, à partir de laquelle l'amorce double-brin se dissocie. Notée T_m (melting temperature), il vaut mieux la choisir entre 52°C et 58°C. Une T_m trop

Synthèses bibliographiques

haute augmente le risque de mauvais appariement, tandis qu'une T_m trop basse montre que l'appariement double-brin de l'amorce sera peu stable, et produira de moins bons résultats. La T_m se détermine par calcul (par exemple approximé par $T_m = 4(G + C) + 2(A + T) \text{ } ^\circ\text{C}$) et on cherchera alors la température d'appariement (T_a) environ 5°C en-dessous.

- La quantité de G et C : les appariements G-C étant plus stables que les appariements A-T, il est bon d'avoir un pourcentage de G et C dans l'amorce d'au moins 40 à 60%.
- Le « GC clamp », c'est-à-dire le nombre de G et C dans les cinq dernières bases à l'extrémité 3' de la séquence. Il vaut mieux en avoir au moins deux. En effet pour que la réplication démarre il faut que l'extrémité 3' soit bien appariée jusqu'au bout, ce qui n'est pas vraiment nécessaire en 5'.

On peut chercher une amorce dans la séquence d'ADN à amplifier avec ApE par exemple.

Une fois qu'on a trouvé une amorce de ce type, on va ajouter à l'extrémité 5' de l'amorce le

site de restriction que l'on veut, pour pouvoir intégrer en su Une fois qu'on a trouvé une

amorce de ce type, on va ajouter à l'extrémité 5' de l'amorce le site de restriction que l'on

veut, pour pouvoir intégrer ensuite dans le plasmide le produit de la PCR. Après ça on ajoute

encore quelques bases pour que le site de restriction ne soit pas « tout au bout » (environ 4-6

bases supplémentaires).(<http://www.neb.com>).

Enfin, il vaut vérifier qu'elle ne s'accroche pas autre part sur le plasmide, y compris sur le

brin complémentaire.(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/howto/design-pcr-primers/>).

Il faut aussi vérifier que l'amorce ne crée pas de structure secondaire ou de dimérisation entre

deux amorces. http://www.nfstc.org/pdi/Subject04/pdi_s04_m01_02_b.htm

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 (Innis et Gelfand, 1994). 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.

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. 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

1.2. La température de fusion (T_f) :

Se situera entre 56 et 62 °C

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

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).

1.4. Les séquences d'amorces 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.

1.5. 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 (Dieffenbach et al., 1995).

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 pcsk1 :

La conception des amorces encadrant le SNP rs623 commence par la recherche de la séquence de référence du gène pcsk1, pour cela la base de donnée « Ensembl » est utilisé grâce au site «www.ensembl.org » comme montré dans la Figure 8.



Figure 8 : la séquence de gène pcsk1 par le site ensembl

Sont représenté en noir les séquences non codante, en rouge les exons ,et en bleu les différents SNP répertoriés.

Pour retrouver la position du rs 6232 nous avons configuré la séquence de telle sorte à rendre visible l'ensemble des SNP du gène PCSK1 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 rs6232.

Matériels et méthode

```
CCTTTCGACACAAGTAACTTACCAAGGTCACACCCTTAGTGAATGGCAGAAGCCAGAAT
TTGAAATCACATACTTTGTCTCTAATACTTGTGCCCTTCATCTGAACATAAGTTTATGT
TATACTAATTTAAAAACAAAACAAAACAGTAACAAGGCCGACAAAAGTTAATATAC
CTATGCCCCATTAATTCATTCATATGCANAACAAATGTTTGTCTTCTGTATGTTTATA
ATTCTTATTTTTCAATCCTCAGACACGGGACCAGATGTGCAGGAGAAATTGCCATGCAAG EXON 8
CATAATCACAAATGCGGGTTGGAGTTGCATACAATTCCAAAGTTGGAGGTAAAACAG rs6232
AGGATTGTCCCTATAGCTTGGCATTTTAATGTGAAGCTTACATCACCCATTGTAAATGGG
GGAGGGGAGCTTTTCTTTTAAACAACACTGGAGGAACAAATTAGTTCATGCCAAAAGTTGCT
```

Figure 6 : séquence de la région encadrant le snprs6232

C: c'est la référence SNP rs6232 trouvé dans l'exon 8 du gène pskl

3. Le design des Primer :

Dans les ressources du National Center for Biotechnology Information (NCBI) nous avons utilisé le logiciel Primer blast 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

Coller la séquence d'intérêt [Clear](#)

Or, upload FASTA file [Parcourir...](#)

Figure 7 : L'outil primer blast

4. Analyse des Résultats du Primer Blast :

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

- Choisir le couple d'amorces qui donne le moins de produits aspécifiques, afin d'amplifier que le produit étudié

Matériels et méthode

- Les températures d'hybridation des deux amorces doivent être le plus proches possibles, car la température d'hybridation lors d'une PCR est programmé en une seule température.
- 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 et perspectives

1_Résultats de la conception des amorces :

Dans un premier temps les 5 couples d'amorces ont été conçues par le site primer blast mais chacun présentait un produit aspécifique de 144 à 225 Paires de bases (pb), donc ce résultat n'est pas pris en compte.

Nous avons, par la suite, élargie la séquence à amplifier, afin de fournir au logiciel un plus large choix de séquences pour les amorces.

Grâce au logiciel primer blast nous avons obtenue un couple d'amorce spécifique à la région encadrant le SNPrs6232 (figure8).

```
CCTTTGCAGACAAGTAACTTACCCAAGGTCACACCCTTAGTGAATGGCAGAAGCCAGAAT
TTGAAATCACATACTTTGTCTCTAATACTTGTGCCCTTCATCTGAACATAAGTTTTATGT
TATACTAATTTAAAACAAACAAACAAAAACAGTAACAAGGCCGACAAAAAGT ATATATAC
CTATGCGCCATTAATTCATTCATATGCCAAAACAAATGTTTGTCTTCTGTATGTTTTATA
ATTCTTATTTTTCAATCCTCAGACACGGGACCAGATGTGCAGGAGAAATTGCCATGCAAG rs6232
CAAATAATCACAAATGCGGGGTTGGAGTTGCATACAATTCCAAAGTTGGAGCTAAAACAG rs6232
AGGATTGTCCCTATAGCTTGGCATTTTAATGTGAAG CTTATCATCAGCCATGTAAATTGGG
GGAGGGGAGCTTTTCTTTTAAACAACACTGGACGAACAAATTAGTTCCATGCCAAAGTTGCT
```

Figure8 : Amorces spécifiques (en vert) encadrant le rs6232.

Il n'y a qu'un seul produit de 244pb, donc les amorces sont bien spécifiques (figure_9').

Le produits de PCR, en utilisant ces amorces a une taille égale à 244pb moins de 250 pb c'est une séquence avec un score de qualité plus bas que la moyenne à cause du phénomène de saturation (plus les fragments sont petits, plus ils sont concentrés et plus le signal obtenu est intense).

Des produits de PCR de plus de 2000 pb pourraient être difficiles à séquencer, la concentration d'ADN devenant un facteur limitant. En effet plus un produit de PCR est long plus sa concentration doit être élevée pour obtenir un résultat de séquençage satisfaisant.

La température d'hybridation des amorces est de 60°C (figure_9'), une température de 55 ° C -72 ° C donne les meilleurs résultats (à noter que cela correspond à une longueur de l'amorce de 18-24 bases).

Résultats et perspectives

La longueur des amorces est de 20 nucléotides (figure_9'). 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.

La teneur en GC : est 35% inférieure à 40% La teneur en GC d'une amorce doit être comprise entre 40 et 60%.

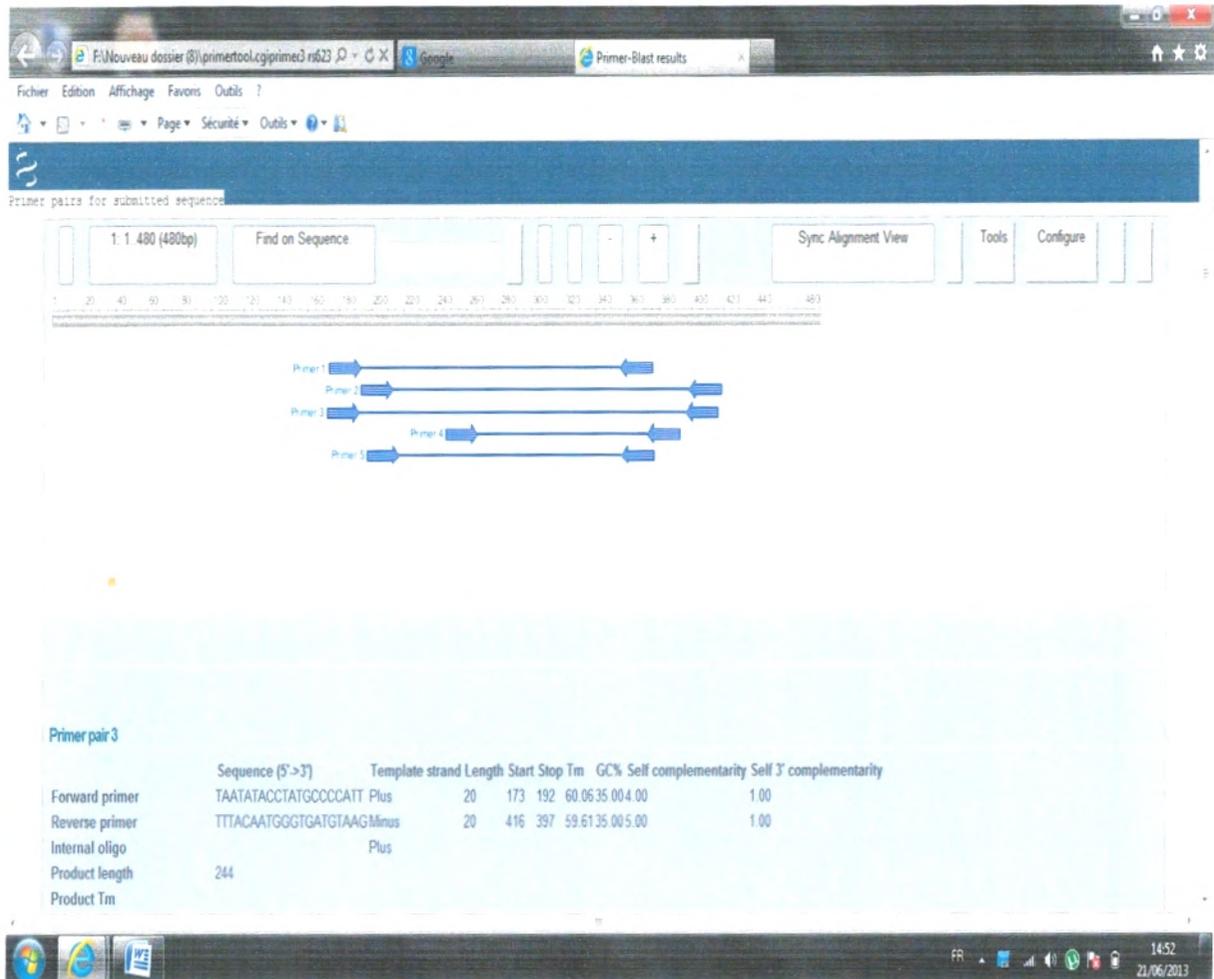


Figure9 : Résultat du Primer blast

2_Confirmations des résultats :

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

Les résultats de cette confirmation ont donné le produit situé sur le chromosome 5 (figure10-). Donc ces résultats nous confirment la fiabilité et la spécificité des amorces que nous avons conçus.

Résultats et perspectives

JavaScript is disabled in your web browser
You must have JavaScript enabled in your web browser to use the Genome Browser

Genomes Genome Browser Tools Mirrors Downloads My Data About Us Help

UCSC In-Silico PCR

```
>chr5:95751672-95751915 244bp TAATATACTATGCCCCATT TTTACAATGGGTGATGTAAG  
TAATATACTATGCCCCATTAACTCACTCATATGCAAAACAATGTCGT  
TCTTCTGTATGTTTATAAATCTTATTTTCAATCTCAGAACGGGACC  
AGATGTGAGGAGAAATGCAATGCAAGCAATTAATCAAAATCGGGGT  
TGGAGTGTATACAATCAAAATGAGGTTAAACAGAGGATGTCCTCT  
ATAGCTGGCATTCTAATGGAAGCTTACATGACCCATTGTAAA
```

Primer Melting Temperatures

Forward: 51.5 C taatatactatgccccatt
Reverse: 51.1 C tttacaatgggtgatgtaag
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](#)

Figur10 : Confirmation des Résultats par le site UCSC in sillico PCR

3-Perspectives :

Nous avons conçus, avec spécificité le couple d'amorces encadrant le SNP rs6232 du gène PCSK1 associé à l'obésité dans la population européenne pour que plu tard ce SNP feras l'objet d'une étude cas-témoins pour voir l'association chez la population algérienne.

cette étape est la conception d'amorces encadrant la variation qui serviront à amplifier la séquence d'oligonucleotide contenant le SNP recherché lors d'une réaction de polymorphisme en chaine donc Il faut faire une PCR pour analyser le snp soit par PCR-RFLP soit par PCR-séquençage.

3_1_Le séquençage de l'ADN :

Consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné. La séquence d'ADN contient l'information nécessaire aux êtres vivants pour survivre et se reproduire. Déterminer cette séquence est donc utile aussi bien pour les recherches visant à

savoir comment vivent les organismes que pour des sujets appliqués. En médecine, elle peut être utilisée pour identifier, diagnostiquer et potentiellement trouver des traitements à des maladies génétiques. En biologie, l'étude des séquences d'ADN est devenue un outil important pour la classification des espèces.

La détermination de la séquence se fait de façon enzymatique avec une ADN polymérase. Afin de fournir une amorce acceptable à la polymérase on prépare un petit morceau d'ADN (18 à 25 nucléotides) ou oligonucléotide complémentaire d'une des deux séquences connues, avec une extrémité 5'P, qui peut être marquée (radio activement ou par fluorochrome) et une extrémité 3'OH.

3_2_Polymorphisme de restriction (RFLP) :

Une différence dans les séquences d'ADN des chromosomes homologues comme révélé par différentes longueurs de fragments de restriction produits par digestion enzymatique d'une région sélectionnée de chromosomes. Les RFLPs sont soupçonnés d'être héréditaire selon les lois mendéliennes et ont été utilisés pour localiser les gènes associés à plusieurs maladies héréditaires, y compris la maladie de Huntington.

3_3_ Etude cas-témoins :

Une étude de cas-témoins (type d'étude observationnelle rétrospective), est une étude statistique utilisée en épidémiologie. Les études cas-témoin sont utilisées pour mettre en évidence des facteurs qui peuvent contribuer à l'apparition d'une maladie en comparant des sujets qui ont cette maladie (les cas) avec des sujets qui n'ont pas la maladie mais qui sont similaires par ailleurs (les contrôles).

Les études cas-témoins sont des études qui sont relativement peu onéreuses et faciles à mettre en place. L'un des succès les plus significatifs de l'étude cas-témoin a été de démontrer le lien entre le tabagisme et le cancer du poumon.

CONCLUSION

Conclusion :

L'obésité est devenue, au bout de quelques années, un phénomène hautement préoccupant au Maghreb, mais particulièrement en Algérie où les statistiques de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) révèlent que 18% de la population en souffrent.

Les chiffres publiés récemment par cette institution mondiale, et rapportés par Jeune Afrique, indiquent dans le même chapitre que la Tunisie compte 17% d'obèses contre 16% au Maroc.

L'Algérie compte désormais près de 6,4 millions de personnes souffrant de cette «maladie» qui prend désormais l'allure d'une épidémie. En 2008, le nombre d'obèses était estimé à près de 5,6 millions seulement. Bien que la différence ne soit pas significative, les filles sont plus obèses que les garçons. Cette prédominance féminine de l'obésité a été trouvée dans d'autres études [16-18]. L'évolution des fréquences du surpoids et de l'obésité est probablement liée au mode de vie.

Plusieurs facteurs sont associés à cette maladie comme la sédentarité, les conditions socio-économiques et la corpulence des parents.

Donc il est important de trouver des causes moléculaires à cette obésité croissante en Algérie. Cela peut être fait par des études d'association.

En effet, le rs6232 (encode N221D) a été montré pour être systématiquement associée à un risque d'obésité. L'analyse fonctionnelle a montré une dégradation importante de l'activité catalytique de la protéine PC1 / 3 mutante N221D.

Il est important de bien concevoir les amorces avant toute manipulation ultérieure concernant l'étude cas témoins en Algérie. Pour cela, il existe plusieurs outils de la bioinformatique qui permettent de retrouver les séquences de référence de n'importe quel gène et de concevoir des amorces spécifiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

• _A_

Allison, D.B., Mentore, J.L., Heo, M., Chandler, L.P., Cappelleri, J.C., Infante, M.C. and Weiden, P.J. (1999) Antipsychotic-induced weight gain: a comprehensive research synthesis. *Am J Psychiatry*, **156**, 1686-96

Allister, E.J., Dhurandhar, N.V., Keith, S.W., Aronne, L.J., Barger, J., Baskin, J.M., Benca, R.M., Biggio, J., Boggiano, M.M., Eisenmann, J.C. *et al.* (2009) Ten putative contributors to the obesity epidemic. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **4**

B

Bell a CG, Walley AJ, Froguel P (2005) La génétique de l'obésité humaine. *Nat Rev Genet* 6: 221-234. doi: [10.1038/nrg1556](https://doi.org/10.1038/nrg1556)

Benjannet, S., Rhainds, D., Essalmani, R., Mayne, J., Wickham, L., Jin, W., Asselin, M.C., Hamelin, J., Varret, M., Allard, D. *et al.* (2004) NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol Chem*, **279**, 48865-75.

Benzinou M, Creemers JW, Choquet H, et al. (2008) Variants communs non synonymes dans PCSK1 risque conférence de l'obésité *Nat Genet* ; 40 :943.-945. [] [] doi: 10.1038/ng.177

Bessesen, D.H. (2008) Update on obesity. *J Clin Endocrinol Metab*, **93**, 2027-34

Berghofer, A., Pischon, T., Reinhold, T., Apovian, C.M., Sharma, A.M. and Willich, S.N. (2008) Obesity prevalence from a European perspective: a systematic review. *BMCPublic Health*, **8**, 200

. Benzinou M, Creemers JW, Choquet H, Lobbens S, Dina C, et al. (2008) Des variantes non synonymes communs dans PCSK1 confèrent risque d'obésité. *Nat Genet* 40: 943-945. doi: [10.1038/ng.177](https://doi.org/10.1038/ng.177)

C

Chagnon YC, Rankinen T, Snyder EE, Weisnagel SJ, Pérusse L, Bouchard C (2002). The human obesity gene map: the update. *Obes Res* 2003; 11: 313-67.

Chang YC, Chiu YF, Shih KC, Lin MW, Sheu

Chagnon YC, Rankinen T, Snyder EE, Weisnagel SJ, Pérusse L, Bouchard C (2002). The human obesity gene map: the update. *Obes Res* 2003; 11: 313-67.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Chang YC, Chiu YF, Shih KC, Lin MW, Sheu WH, et al. (2010) Common PCSK1 haplotypes sont associés à l'obésité dans la population chinoise. *Obésité (Silver Spring)* 18: 1404-1409. doi: [10.1038/oby.2009.390](https://doi.org/10.1038/oby.2009.390)

. Chagnon YC, Rankinen T, Snyder EE, Weisnagel SJ, Pérusse L, Bouchard C(2002). The human obesity gene map: the update. *Obes Res* 2003; 11: 313-67.

Chang YC, Chiu YF, Shih KC, Lin MW, Sheu WH, et al. (2010) Common PCSK1 haplotypes sont associés à l'obésité dans la population chinoise. *Obésité (Silver Spring)* 18: 1404-1409. doi: [10.1038/oby.2009.390](https://doi.org/10.1038/oby.2009.390) .

CJ Willer, Speliotes EK, Loos RJ, Li S, Lindgren CM, et al. (2009) Six nouveaux loci associés à l'indice de masse corporelle mettent en évidence une influence neuronale sur la régulation du poids corporel. *Nat Genet* 41: 25-34.

• F

Farooqi IS, Volders K, Stanhope R, et al. (2007) Hyperphagia and early-onset obesity due to a novel homozygous missense mutation in prohormone convertase 1/3. *J Clin Endocrinol Metab*;92:3369-73.

Farooqi, I.S. and O'Rahilly, S. (2008) Mutations in ligands and receptors of the leptin-melanocortin pathway that lead to obesity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, **4**, 569-77

Farooqi IS, Volders K, R Stanhope, Heuschkel R, Blanc A, et al. (2007) hyperphagie et obésité précoce due à une nouvelle mutation faux-sens homozygote dans prohormone convertase 1/3. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 3369-3373. doi: [10.1210/jc.2007-0687](https://doi.org/10.1210/jc.2007-0687) .

Friso, S. and Choi, S.W. (2005) Gene-nutrient interactions in one-carbon metabolism.

Curr Drug Metab, **6**, 37-46.

G

Creemers JW, Jackson RS, Hutton JC (1998) de régulation moléculaire et cellulaire du traitement prohormone. *Semin cellulaire Dev Biol* 9: 3-10. doi: [10.1006/scdb.1997.0195](https://doi.org/10.1006/scdb.1997.0195)

Creemers JW, Choquet H, P Stijnen, Vatin V, Pigeyre M, et al. (2011) causant des mutations hétérozygotes partielle prohormone convertase 1 Déficit contribuer à l'obésité humaine. *Le diabète* doi: [10.2337/db11-0305](https://doi.org/10.2337/db11-0305) .

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Creemers, J.W. and Khatib, A.M. (2008) Knock-out mouse models of proprotein convertases: unique functions or redundancy? *Front Biosci*, **13**, 49

J_

James, W.P. (2008) The epidemiology of obesity: the size of the problem. *J Intern Med*, **263**, 336-52.

Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, et al. (1997) Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet*;16:303-6.

Jackson RS, Creemers JW, Farooqi IS, Raffin-Sanson ML, Varron A, et al. (2003) dysfonctionnement de l'intestin grêle accompagne le endocrinopathy complexe de l'homme pro-protéine convertase 1 carence. *J Clin Invest* 112: 1550-1560. doi: [10.1172/JCI200318784](https://doi.org/10.1172/JCI200318784)

Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, Raffin-Sanson ML, Sanders L, et al. (1997) L'obésité et le traitement de prohormone altération associée à des mutations dans le gène prohormone convertase 1 humain. *Nat Genet* 16: 303-306. doi: [10.1038/ng07](https://doi.org/10.1038/ng07)

-K_

Kilpelainen, Bingham SA, Khaw KT, Wareham NJ, Loos RJ (2009) Association des variantes dans le gène PCSK1 à l'obésité dans l'étude EPIC-Norfolk. *Hum Mol Genet* 18: 3496-3501. doi: [10.1093/hmg/ddp280](https://doi.org/10.1093/hmg/ddp280) .

L .

Li H, Wu Y, Loos RJ, Hu FB, Liu Y, et al. (2008) Des variantes de la masse grasse et associées à l'obésité (FTO), le gène ne sont pas associés à l'obésité dans une population chinoise Han. *Diabetes* 57: 264-268.

Levy JC, Matthews DR, Hermans MP (1998) Corriger l'homéostasie modèle d'évaluation (HOMA) évaluation utilise le programme informatique. *Diabetes Care* 21: 2191-2192. doi:

• _M_

49. Minet-Ringuet, J., Even, P.C., Valet, P., Carpenne, C., Visentin, V., Prevot, D., Daviaud, D., Quignard-Boulange, A., Tome, D. and de Beaurepaire, R. (2007) Alterations of lipid metabolism and gene expression in rat adipocytes during chronic olanzapine treatment. *Mol Psychiatry*, **12**, 562-71.

O

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Olds, T.S., Tomkinson, G.R., Ferrar, K.E. and Maher, C.A. (2010) Trends in the prevalence of childhood overweight and obesity in Australia between 1985 and 2008. *Int J Obes (Lond)*, **34**, 57-66

O'Rahilly S, Gris H, Humphreys PJ, Krook A, Polonsky KS, et al. (1995) Rapport succinct: traitement altération de prohormones associés à des anomalies de l'homéostasie du glucose et la fonction surrénalienne. *N Engl J Med* 333: 1386-1390. doi: 10.1056/NEJM199511233332_Q

Q Qi, Li H, Loos RJ, Liu C, Hu FB, et al. (2010) Association des PCSK1 rs6234 avec l'obésité et des traits liés à une population chinois

R

Renstrom F, F Payne, Nordstrom A, Brito CE, Rolandsson O, et al. (2009) La réplication et l'extension de l'ensemble du génome des résultats d'étude de l'Association pour l'obésité chez les adultes 4923 dans le nord de la Suède. *Hum Mol Genet* 18: 1489-1496. doi: [10.1093/hmg/ddp041](https://doi.org/10.1093/hmg/ddp041) .

. Rouskas K, Kouvatsi A, Paletas K, Papazoglou D, Tsapas A, et al .. (2011) Des variantes communes dans FTO, MC4R, TMEM18, PRL, AIF1 et PCSK1 montrer des preuves d'association avec l'obésité des adultes dans la population grecque. *Obésité (Silver Spring)*.

Ramachan drappa S, Farooqi IS (2011) des approches génétiques pour comprendre l'obésité humaine. *J Clin Invest* 121: 2080-2086. doi: [10.1172/JCI46044](https://doi.org/10.1172/JCI46044) .

Rouskas K, Kouvatsi A, Paletas K, Papazoglou D, Tsapas A, et al .. (2011) Des variantes communes dans FTO, MC4R, TMEM18, PRL, AIF1 et PCSK1 montrer des preuves d'association avec l'obésité des adultes dans la population grecque. *Obésité (Silver Spring)*.

S

Sandholt CH, Sparso T, Grarup N, Albrechtsen A, Almind K, et al. (2010) Combiné analyses des 20 variants communs de susceptibilité à l'obésité. *Diabetes* 59: 1667-1673. doi: [10.2337/db09-1042](https://doi.org/10.2337/db09-1042)

T

Thomas, G. (2002) Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 753-66.

Taylor, N.A., Van De Ven, W.J. and Creemers, J.W. (2003) Curbing activation: proprotein convertases in homeostasis and pathology. *Faseb J*, **17**, 1215-27. , A.,

Thorleifsson G, Walters Go, Gudbjartsson DF, Steinthorsdottir V, Sulem P, et al. (2009) échelle du génome rendements des associations nouveaux variants de séquence à sept loci qui associent des mesures de l'obésité. *Nat Genet* 41: 18-24

V

Visscher, P.M., Hill, W.G. and Wray, N.R. (2008) Heritability in the genomics era-- concepts and misconceptions. *Nat Rev Genet*, **9**, 255-66.

Villalobos-Comparán M, Villamil-Ramírez H, et al. (2012). PCSK1 rs6232 est associée à l'enfance et l'obésité chez les adultes de la classe III à la population mexicaine. *PLoS ONE* 7 (6): e39037.

W

W, Cho YS, Zheng W, Dorajoo R, Kato N, et al. (2012) Méta-analyse identifie les variants communs associés à l'indice de masse corporelle chez les Asiatiques de l'Est. *Nat Genet* 44: 307-311

Y

Yang, L.H., Chen, T.M., Yu, S.T. and Chen, Y.H. (2007) Olanzapine induces SREBP-1-related adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Pharmacol Res*, **56**, 202-8.

Z

. Zhou, A., Martin, S., Lipkind, G., LaMendola, J. and Steiner, D.F. (1998) Regulatory roles of the P domain of the subtilisin-like prohormone convertases. *J Biol Chem*, **273**, 11107

Zhou BF (2002) Les valeurs prédictives de l'indice de masse corporelle et le tour de taille pour les facteurs de certaines maladies liées au chinois adultes étude sur les points de coupure optimale de l'indice de masse corporelle et le tour de taille chez les adultes chinois risque. *Biomed Environ Sci* 15: 83-96.

résumé

Introduction : L'obésité : est un trouble complexe fortement influencé par des facteurs génétiques et environnementaux.

Il existe plusieurs gènes impliqués dans l'obésité parmi eux Le gène PCSK1 qui code pour une enzyme qui est responsable de la conversion de pro hormones en hormones impliquées dans la régulation du métabolisme énergétique.

Ce qui implique que des variants commun du gène PCSK1 pourrait prédisposer à l'obésité dans la population générale ; le variant rs6234, le variant rs6235 et le variant rs6232 (T > C, N221D) ont été associé à l'obésité dans la population européenne.

Ces études d'association se font grâce à l'outil important de réaction de polymérisation en chaîne PCR. Dans la mise au point de la PCR, le choix d'amorces est crucial, plusieurs critères interviennent dans ce choix.

Objectif : Nous allons concevoir, avec spécificité le couple d'amorce encadrant le SNP rs 6232 du gène PCSK1 associé à l'obésité dans la population européenne.

But : Le couple d'amorces conçue au cours de ce travail servira à étudier l'implication du rs6232 dans l'obésité chez la population Algérienne ; lors d'études ultérieures cas-témoins.

Matériels et méthodes : Recherche de la séquence de référence du gène PCSK1 dans la base de données ensembl et utilisation du logiciel primer blast.

Résultats : Un couple d'amorces spécifiques a été choisi donnant un seul produit spécifique d'amplification de 244pb contenant le SNP rs6232

Mots clés : Obésité, Gène PCSK1, Amorces, rs6232, Produit spécifique.

Introduction: The obesity is a complex disorder strongly influenced by genetic and environmental factors. There are several genes involved in obesity among them PCSK1 The gene which encodes an enzyme which is responsible for the conversion of prohormones into hormones involved in the regulation of energy metabolism.

This implies that the common variants PCSK1 gene may predispose to obesity in the general population, the variant rs6234, rs6235 variant and the variant rs6232 (T> C, N221D) were associated with obesity in the European population .

These association studies are due to the important tool of polymerase chain reaction PCR. In the development of PCR, the choice of primers is crucial, several criteria involved in the choice.

Objective: We will design with the specific primer flanking the SNP rs 6232 PCSK1 gene associated with obesity in the European population torque.

Purpose: The pair of primers designed in this work serve to study the involvement of rs6232 in obesity in the Algerian population in subsequent case-control studies.

Materials and Methods: Search the reference sequence of the gene in PCSK1 ensembl data base and using the software primer blast.

Results: A pair of specific primers was chosen giving a single specific amplification product containing the SNP rs6232 244pb

Keywords: Obesity, Gene PCSK1, Primers, rs6232, specific product.