

UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES – FES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE



PROJET DE FIN D'ETUDES
Licence en Sciences & Techniques :
Biologie & Santé

**polymorphisme 56C>G de l'APOA5 en association avec le
syndrome métabolique**

Présentée par : M^{elle} Baba Fatima Zahra

Encadrée par:

Professeur HALOTI SAID : FSTF

Docteur ROUBA HASSAN : Institut Pasteur du Maroc

Soutenu le 15/06/2011

Devant le jury composé de :

- | | | |
|------------------------------------|----------|------------------|
| ➤ Professeur HALOTI Said | : | Président |
| ➤ Professeur IRAQUI Mohamed | : | Examineur |
| ➤ Docteur ROUBA Hassan | : | Examineur |

Année Universitaire:

ABBREVIATIONS

aa : Acide Aminé

ADNc: ADN complémentaire

AG : Acide Gras

AGL: Acide Gras Libre (FFA: Free Fatty Acid)

Apo : Apolipoprotéine, apoprotéine

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

CETP : Cholesterol Ester Transfer Protein, Protéine de Transfert des Esters de Cholestérol

CI : Intervalle de Confiance

CL: Cholestérol Libre

CM: Chylomicrons

cm : centimètre

ddl: Degré de liberté

DO: Densité Optique

DT2: Diabète type 2

EC: Ester de Cholestérol

EGIR: European Group for the study of Insulin Resistance

ELISA: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

FXR: Farnesoid X-activated Receptor

g/ml : gramme/millilitre

GLU: Glucose

GLY: Glycémie

HDL : High Density Lipoprotein, Lipoprotéine de Haute Densité

HL : Lipase Hépatique (LIPC)

HTA: Hypertension artérielle

HTG: hypertriglycéridémie

IDF: International diabete federation, fédération international du diabète

IDL : Intermediate Density Lipoprotein, Lipoprotéine de Densité Intermédiaire

IMC: Indice de Masse Corporelle

IR: Insulino-Résistance

kb: kilobase

kDa: kiloDalton

Kg/m²: kilogramme/mètre²

LCAT: Lecithin Cholesterol Acyl Transferase

LDL: Low Density Lipoprotein, Lipoprotéine de Basse Densité
LDLR: Low Density Lipoprotein Receptor, Récepteur de Lipoprotéine de Basse Densité
LIPG: lipase endothéliale
Lp : Lipoprotéine
LPL : Lipoprotéine Lipase
LSR: Lipolysis Stimulated Receptor
LRP : LDLR Related Protein, Protéine Apparentée au LDLR
LRTG: lipids Riches en Triglycérides
LXR: Liver X-activated Receptor
m: mètre
MCV: Maladies Cardio-Vasculaires
Mg/dl : milligramme/décilitre
mmHg: millimètre de Mercure
mmol : millimole
NCEP ATP III: National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III
ng/l: nanogramme/litre
nm : nanomètre
OMS: Organisation Mondiale de la Santé (WHO)
OR: Odds Ratio
pb : paire de base
PCR : Polymerase Chain Reaction, Réaction de Polymérisation en Chaîne
PI3K: la voie Pi3 kinase
PL: Phospholipides
PLTP : Phospholipid Transfer Protein, Protéine de Transfert des Phospholipides
pp.: pages
PP1/PP2A: type 1 and 2A Protein Phosphatase
PPAR α : Peroxysome-Proliferator-Activated Receptor alpha
R: Recepteur
RAP: Regeneration Associated Protein, protéine associée à la régénération
RE: Reticulum Endoplasmique
ROR α : Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor
SD: Déviation Standard
SM: Syndrome Métabolique
SNP: Single Nucleotid Polymorphisms (polymorphismes)
SR-B1: Scavenger Receptor class B1, récepteur d'épuration de classe B1

SREBP-1c: Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c

T, C, G, A: Thymine, Cytosine, Guanine, Adénine (bases azotées)

T: Température (en °C)

TG : Triglycérides

TH: Tour de Hanche

TRC (TCR): Transport Reverse du Cholestérol

TT: Tour de Taille

USF1/2: Upstream Stimulatory Factor 1 et 2

UTR: Untranslated Regions

VLDL : Very Low Density Lipoprotein, Lipoprotéine de Très Basse Densité

X²: Test de Khi deux (ou Khi carré)

µg/l: microgramme/litre

µl: microlitr

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Définition du syndrome métabolique selon différents auteurs

Tableau II: Caractéristiques physiques et chimiques des lipoprotéines plasmatiques humaines

Tableau III: Distribution des sujets étudiés selon les paramètres cliniques (valeurs moyenne ou n %).

Tableau IV: Identité, expression tissulaire et distribution plasmatique des apolipoprotéines

Tableau V: Comparaison des paramètres biochimiques chez les sujets étudiés (valeurs en moyenne \pm SD)

Tableau VI: Distribution des différents génotypes chez les deux groupes

Tableau VII : association des allèles C et G chez les deux groupes.

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Métabolisme des VLDL produites par le foie. Genèse des particules LDL

Figure 2: voie endogène ou d`apport les lipides vers tissus périphérique

Figure3: Métabolisme des particules HDL. CE : cholestérol estérifié ; CNE : cholestérol non estérifié

Figure 4: structure génomique de *l'APOA5* et localisation des polymorphismes

Figure 5: Les mécanismes proposés sous l'effet TG-abaissement des apoAV.

Figure 6: Hydrolyse des lipoprotéines riches en TG

Figure 7: Profil électrophorétique des produits PCR du gène *APOA5* (56C>G)

Figure 8: Profil électrophorétique des produits PCR digérés par l`enzyme *Taq I*

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I -Le Syndrome Métabolique (SM).....	1
I.1- définition	1
I.2-Historique.....	2
I.3-La prévalence du syndrome métabolique.....	2
II- Les lipoprotéines.....	3
II.1- Structure générales des lipoprotéines.....	3
II.2- Classification.....	3
II.3- Les apolipoprotéines.....	4
II.4 - classification des apolipoproteines.....	5
II.5- métabolisme des lipoprotéines.....	6,7
II.6- L'apolipoprotéins apoAV.....	8
II.6.1- Découverte du gène APOA5.....	9
II.6.2- Le gène humain APOA5	9
II.6.2.1- Structure du gène	9
II.6.2.2- Régulation de l'expression du gène APOA5.....	10
II.7- L'apolipoprotéins A-V.....	11
II.7.1- Structure, Expression tissulaire et distribution sur les lipoprotéines circulantes.....	11
II.7.2- Mécanisme d'action	11
III- Étude des polymorphismes dans la population générale chez l'Homme.....	12
III.1- définition.....	12
III.2- Les SNP.....	12
III.3- Les Haplotypes.....	12
IV- Étude de populations.....	13
MATERIEL & METHODES	
I-Échantillonnage.....	15
II-Étude clinique.....	15
III-Étude biochimique.....	15
IV- Étude moléculaire.....	16
IV.1- Extraction d'ADN génomique au Phénol-Chloroforme	16
IV.1.1- Principe.....	16
IV.1.2- Protocole expérimental.....	

IV. 2- Amplification d'ADN par PCR	17
IV.2.1- Principe.....	18
IV.2.2- Les composantes d'une réaction PCR.....	18
IV.3- Électrophorèse sur gel d'Agarose	18
IV.4- Digestion enzymatique	19
IV.4.1- Recherche du polymorphisme 56 C>G.....	20
V- Etude statistique.....	20
RESULTATS & DISCUSSIONS	21
I-Résultats.....	23
I.1- Analyse clinique.....	
I.2- Analyse biochimique.....	
I.3- Analyse moléculaire.....	
DISCUSSION.....	
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	
REFERENCES	
BIBLIOGRAPHIQUES.....	
ANNEXES.....	

.

INTRODUCTION GENERALE

Les maladies cardiovasculaires (MCV), représentent aujourd'hui l'une des principales causes de mortalité. Chez l'Homme, cela résulte, en partie, d'une augmentation importante de la prévalence de différents facteurs de risques associés à ces maladies (obésité, insulino-résistance, dyslipidémies, hypertension artérielle...). Par ailleurs, une tendance au regroupement chez un même individu de plusieurs de ces facteurs a été observée, ce qui a donné naissance au concept de syndrome métabolique (SM) caractérisé par un risque cardiovasculaire élevé. Aujourd'hui, la prévalence du SM au Maroc est de 12,18% selon l'étude de K. Bertal filali (K. Bertal filali et al 2010).

Les influences environnementales jouent un rôle dans le développement du SM. Pour certains désordres métaboliques, il a été démontré que la variabilité génétique à différents loci est associée à l'augmentation du risque du SM.

Le défaut d'expression du gène APOA5, localisé chez l'Homme sur le chromosome 11 en q23 est associé avec des taux de triglycérides plasmatiques très élevés.

Il existe plusieurs polymorphismes du gène APOA5 (-1131T>C, 56C>G, -3A>G, IVS3+476G>A, -12,238T>C, 1259T>C,...). Dans ce travail, nous nous sommes intéressé au polymorphisme 56C>G (appelé aussi S19W), qui est associé à l'augmentation du risque du Syndrome Métabolique.

L'objectif de ce travail consiste à étudier le polymorphisme génétique du gène APOA5 chez une population marocaine, en mettant en valeur son association avec le syndrome métabolique et ceci en trois étapes:

- ✓ Étude des caractéristiques cliniques et des paramètres biochimiques.
- ✓ Étude génétique du polymorphisme (56C>G) par la technique (PCR- RFLP), et recherche de leurs associations avec le syndrome métabolique.
- ✓ Étude d'association des caractéristiques cliniques, biochimiques et génétiques de la population marocaine.

I- Le Syndrome Métabolique (SM)

I.1- définition

Le SM, comme son nom l'indique n'est pas une maladie spécifique mais désigne une combinaison d'anomalies métaboliques reliées entre elles, associées à des facteurs de risque cardio-vasculaires qui incluent aussi bien le diabète de type 2, l'obésité, la dyslipidémie et l'hypertension. La résistance d'insuline et l'obésité viscérale ont été identifiées comme les facteurs de risques les plus graves (*DUVNJAK L., 2009*).

Tableau I: Définition du syndrome métabolique selon différents auteurs (*BAILLOT A., 2010*).

OMS 1999	EGIR 1999	NCEP ATP III 2001	FID 2005
Conditions obligatoires			
Intolérance au glucose ou insulino-résistance ou diabète de type 2	Hyperinsulinémie (non diabétique)	Pas de condition initiale obligatoire	Obésité abdominale
+ 2 de ces altérations	+ 2 de ces altérations	3 ou plus de ces altérations	+ 2 de ces altérations
OBESITE			
IMC > 30 kg/m² ou T/H : > 0,9 (H) et 0,85 (F)	Tour de taille : ≥ 94 cm (H) ≥ 80 cm (F)	Tour de taille : ≥ 102 cm (H) ≥ 88 cm (F)	Tour de taille ≥ 94 cm (H) ≥ 80 cm (F)
HYPERTENSION			
Pression artérielle ≥ 140/90mmHg	Pression artérielle ≥ 140/90mmHg	Pression artérielle ≥ 130/85mmHg	Pression artérielle Systolique ≥ 130 mmHg Diastolique ≥ 85mmHg
DYSLIPIDEMIE			
HDL-C < 0,9 mmol/l (H) < 1 mmol/l (F) ou TGY > 1,7 mmol/l	HDL-C < 1 mmol/l ou TGY > 2 mmol/l	HDL-C < 1,3 mmol/l (H) < 1,29 mmol/l (F) Et TGY > 1,7 mmol/l	HDL-C < 1,03 mmol/l (H) < 1,29 mmol/l (F) Et TGY > 1,7 mmol/l

OMS = Organisation Mondiale de la Santé;

EGIR = European Group for the Study of Insulin Resistance;

NCEP ATP III= National Cholesterol Education Program—Third Adult Treatment Panel;

FID = Fédération Internationale du Diabète, (H = Homme, F= Femme ; HDL -C = High Densité Lipoprotéine-Cholestérol ; TGY = Triglycérides)

I.2- Historique

La découverte et mise en relation des nombreux facteurs constituant le syndrome métabolique a pris un temps considérable (Legry, 2009).

- 1923: **Kylin** associa pour la première fois la maladie de la goutte, l'hyperglycémie et l'hypertension artérielle.
- 1956: **Vague** lia ce syndrome à l'obésité abdominale.
- 1985: **Modan** établit la relation entre ce même syndrome et l'hyperinsulinémie.
- 1988: **Reaven** donna pour la première fois le nom de «Syndrome X» à cette pathologie et l'associa à l'insulinorésistance.
- Années 1990 à ce jour: Cet ensemble de critères a reçu le nom de « Syndrome de l'insulinorésistance», puis le nom de « Syndrome métabolique », nom officiellement utilisé aujourd'hui pour désigner ce désordre métabolique.

I.3- La prévalence du syndrome métabolique

Aux Etats-Unis, la prévalence du syndrome métabolique est d'environ 20 à 30% chez les personnes adultes selon une étude publiée en 2002 (ES Ford, Giles, and Dietz 2002).

En ce qui concerne le Maroc, une prévalence d'environ 16,3% a été signalée selon une étude réalisée sur une population sahraouie du sud du Maroc, et qui a porté sur 249 femmes âgées de 15 ans et plus (Rguibi and Belahsen 2004).

Selon une autre étude, environ 29,8% des femmes Marocaines d'origine Sahraouie sont hypertendues (Rguibi et Belahsen 2007).

Selon l'étude de K. Bertal filali (K. Bertal filali et al 2010). Aujourd'hui, la prévalence du SM au Maroc est de 12,18%

Cette étude démontre aussi l'impact de l'âge, l'obésité et l'alphabétisation sur la diminution du taux du SM chez les personnes concernées.

Les résultats de cette étude sont confirmés par El Ayachi et al. (2008) qui ont montré que la prévalence du syndrome métabolique est d'environ 17,8% sur une cohorte de 213 femmes Marocaines.

Les anomalies lipidiques observées au cours du syndrome métabolique et du diabète de type 2 sont à la base d'une augmentation importante du risque cardiovasculaire. La dyslipidémie du syndrome métabolique et le diabète de type 2 sont caractérisées par la

présence d'anomalies quantitatives et qualitatives des lipoprotéines.

II- Les lipoprotéines

II.1- Structure générale (Figure 1)

Les lipoprotéines sont des macromolécules sphériques de composition et taille variables, et de structure identique.

Elles sont formées d'un corps lipidique hydrophobe contenant essentiellement des triglycérides et des esters de cholestérol, enrobées d'une monocouche de lipides polaires constituée de phospholipides et de cholestérol libres. Des protéines spécifiques, nommées apolipoprotéines (apo), à la surface des lipoprotéines assurent la stabilité de la macromolécule et en contrôlent le devenir métabolique (Acton S et R 1996).

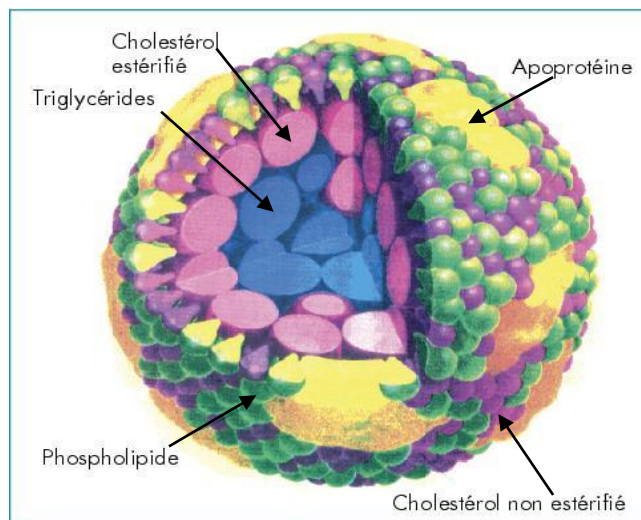


Figure 1: Structure d'une lipoprotéine (*Andreelli et Jacquier, 2006*)

II. 2- Classification:

Le tableau II montre que les lipoprotéines forment plusieurs classes distinctes selon leur composition et leur propriété physique. De nombreuses techniques permettent d'isoler les lipoprotéines à partir du plasma. L'ultracentrifugation sépare les principales d'entre elles par densité croissante: les chylomicrons **CM** (sur les échantillons post-prandiaux), les **VLDL** (very low density lipoprotein), les **LDL** (low density lipoprotein) et les **HDL** (high density lipoprotein). L'électrophorèse sur gel d'agarose, plus rarement utilisée, sépare les lipoprotéines en fonction de leur charge électrique (α pré β et β).

Tableau II: Caractéristiques physiques et chimiques des lipoprotéines plasmatiques humaines
(Lagrost et al., 2003)

Type de lipoprotéine	Mobilité électrophorétique	Densité (g/ml)	Taille (nm)	Proportion EC/TG	Principale apolipoprotéine (Apo)
CM	Pas de migration	0,93	75-1200	1/19	B48, E, C
VLDL	Préβ	0,93-1,006	30-80	1/3,3	B100, E, C
IDL	Préβ lent	1,006-1,019	27-35	1/3,5	B100, E
LDL	B	1,019-1,063	18-27	1/0,23	B100
HDL2	A	1,063-1,125	9-12	1/0,22	AI, AII, C
HDL3	A	1,125-1,210	7-9	1/0,19	AI, AII, C
PréβHDL	Préβ	1,210-1,250	<7(disque)	Nd	AI
Lp (a)	-	1,040-1,115	25	-	B100, (a)

IDL: intermediate Density Lipoprotein, **EC:** ester de cholestérol, **ND:** non-déterminé

II .3- Les Apolipoprotéines

Les apolipoprotéines jouent un rôle fondamental dans le métabolisme lipidique. Elles représentent l'élément clé responsable de la stabilité et de la solubilisation des lipoprotéines dans le milieu aqueux, permettant ainsi leur transport dans le plasma. Elles agissent aussi comme cofacteurs ou activateurs d'enzymes et comme ligands spécifiques de récepteurs membranaires impliqués dans le métabolisme lipidique.

Les différentes apolipoprotéines sont synthétisées principalement dans l'intestin et le foie. Elles sont interchangeables entre les lipoprotéines au cours du métabolisme lipidique, bien que l'apolipoprotéine B ne la soit pas

II.4: Classification

Les apolipoprotéines les plus importantes sont les suivantes : apo A-I, apo A-II, apo A-IV, apo A-V, apo B, apo C-I, apo C-II, apo C-III, apo C-IV, apo E et ses différentes isoformes, apo D (ou A-III) et l'apo F.

Les principales caractéristiques de ces différentes apolipoprotéines sont présentées dans le tableau III.

Tableau III: Identité, expression tissulaire et distribution plasmatique des apolipoprotéines (Lagrost et *al.*, 2003).

Nom apolipoprotéines	Principaux tissus d'expression	Distribution lipoprotéique	Fonctions majeures
A-I	Foie, intestin	HDL, CM	+LCAT, +CETP, +PLTP, structure, TCR
A-II	Foie, intestin	HDL, CM	-LCAT, +HL+ CETP, structure, TCR
A-IV	Foie, intestin	HDL, CM	+LCAT, +CETP, TCR, métabolisme des LRTG
A-V	Foie	HDL, CM, VLDL	+LCAT, +CETP, +PLTP, structure, TCR
B48	Intestin	CM, remnant	Structure, sécrétion, CM, ligand LDLR
B100	Foie	VLDL, LDL, IDL	Structure, sécrétion VLDL, ligand LDLR
C-I	Foie, intestin	HDL, CM, VLDL	+LCAT, -CETP, HL
C-II	Foie, intestin	HDL, CM, VLDL	+LPL
C-III	Foie, intestin	HDL, CM, VLDL	-LPL, +LCAT
C-IV	Foie	VLDL	-LPL
E	Foie, macrophage, cerveau	HDL, VLDL, CM, remnant	Ligand LDLR et LRP

LCAT: Lecithin Cholesterol Acyl Transferase, **CETP** :, Protéine de Transfert des Esters

de Cholestérol, **LPL** : Lipoprotéine Lipase, **LDLR**: Low Density Lipoprotein Receptor, Récepteur de Lipoprotéine de Basse Densité, **LRP** : LDLR Related Protein, Protéine Apparentée au LDLR, **PLTP** : Phospholipid Transfer Protein, Protéine de Transfert des Phospholipides, **TCR**: Transport Reverse du Cholestérol, **LRTG**: lipids Riches en Triglycérides

I.5. Métabolisme des lipoprotéines

Les lipoprotéines transportent les lipides alimentaires selon 3 voies:

- + Voie exogène (de l'intestin vers les autres tissus),
- + Voie endogène (du foie aux autres tissus) et
- + Voie de retour (des tissus au foie).

- **Voie enter-hépatique ou exogène**: c'est la voie par laquelle se fait le transport des lipides alimentaires vers les tissus pour la production d'énergie, le stockage ou la synthèse de molécules. Les lipides alimentaires sont hydrolysés dans l'intestin grêle et sont absorbés par les cellules épithéliales intestinales. Les lipides y seront réestérifiées et assemblées à l'aide de l'apo B-48 pour former des chylomicrons. L'apo B-48 est nécessaire à la formation des CM (figure 2)

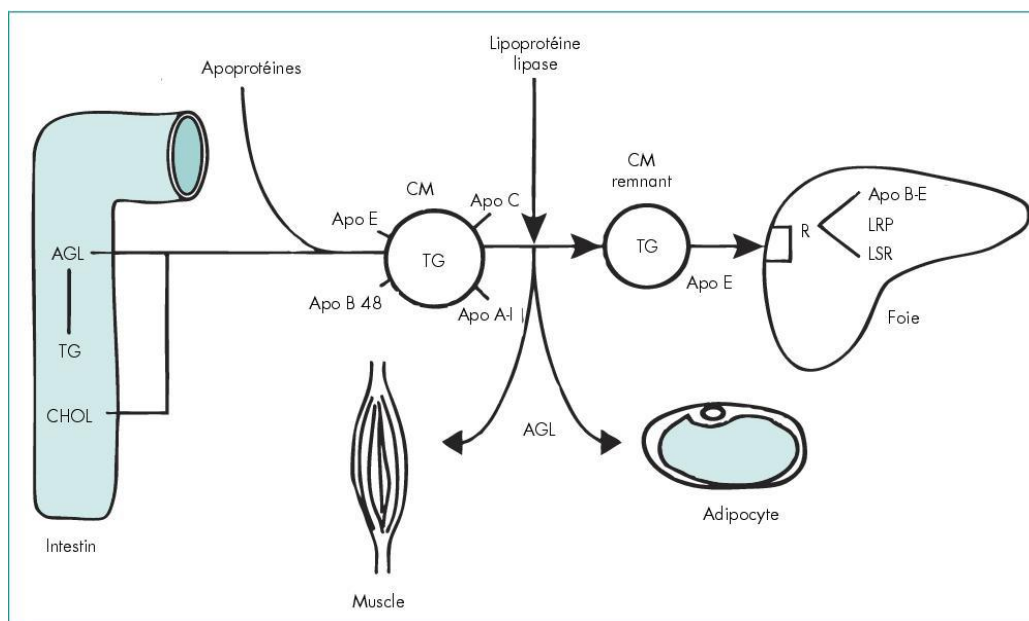


Figure 2: voie exogène ou d'apport les lipides vers les tissus périphériques. (Andreelli et Jacquier, 2006)

• **Voie d'apport ou endogène:** c'est le transport des lipides du foie vers les tissus périphériques (Figure 3). Les lipides synthétisés au niveau du foie, sont acheminés par les VLDL. De la même manière que les CM dans la voie exogène, ces VLDL seront hydrolysées par la LPL ensuite par les lipases hépatiques (LH) initie une cascade lipolytique générant des IDL et des LDL, menant ainsi aux LDL fortement enrichie en cholestérol estérifié. ensuite, les apo des VLDL sont éliminés, soit par échange, soit par libération dans le plasma. Il ne reste alors qu'une seule molécule d'apo B-100 nécessaire au maintien de l'intégrité du LDL dont le rôle est d'apporter du cholestérol aux tissus périphériques. Les LDL seront éliminés de la circulation par le R-LDL qui reconnaît l'apo B-100.

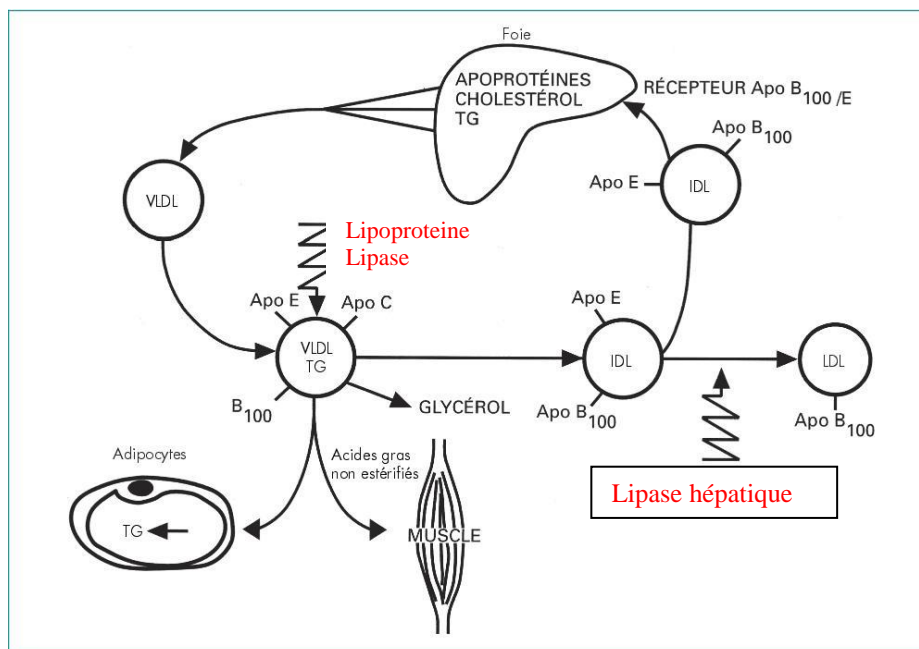


Figure3: Métabolisme des VLDL produites par le foie. Genèse des particules LDL. (Andreelli et Jacquier, 2006)

Voie de retour ou inverse : Le foie est le principal organe qui permet à l'organisme d'éliminer le cholestérol excédentaire via les HDL.

Les particules HDL recevant du CL et des EC sont donc des particules enrichies de cholestérol périphérique

Elles seront captées par des récepteurs présents dans le foie, une partie du cholestérol sera recyclée mais une autre partie sera éliminée par les voies biliaires dans le tube digestif.

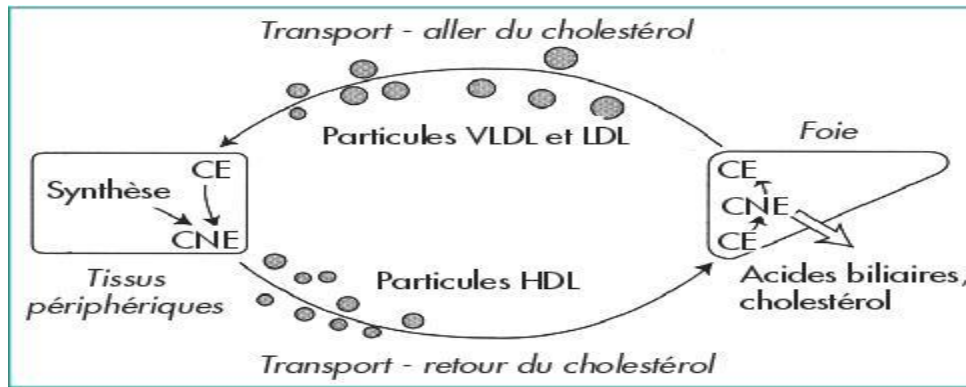


Figure 4 Métabolisme des particules HDL. **CE** : cholestérol estérifié; **CNE**: cholestérol non estérifié. .
(Andreelli et Jacquier, 2006)

II- L'Apolipoprotéine apoA-V

II -1- Découverte du gène APOA5

- Régénération hépatique précoce chez le rat (RAP 3)

L'équipe hollandaise de Van Der Vliet (2001) a identifié 3 gènes inconnus dénommés Regeneration Associated Protein (RAP) 1, 2 et 3 exprimés à la phase précoce de la régénération hépatique suite à une hépatectomie partielle (70 %) chez le rat. Le gène **RAP 3** était celui dont l'ARNm était le plus fortement exprimé.

La séquence de l'ADN complémentaire (ADNc) hépatique de rat présente 90% d'homologie avec une séquence inconnue d'un clone d'expression d'ADNc de foie de souris, et 80% d'homologie avec la séquence du chromosome humain 11q23 située à proximité du cluster APOA1/C3/A4.

La protéine RAP3 codée par ce gène jusque-là inconnu, possédait un peptide signal clivable traduisant la capacité sécrétoire de cette protéine exprimée dans le foie, une homologie de 20 à 28 % avec les apolipoprotéines AIV et AI de différentes espèces, et une structure secondaire de type alpha-hélicoïdale. L'ensemble de ces caractéristiques, puis la mise en évidence de la protéine dans le plasma de rat témoin associée aux particules HDL, ont finalement permis de la renommer apolipoprotéine AV (apoAV).

- Comparaison génomique entre l'homme et la souris

La comparaison génomique consiste à réaliser un séquençage comparatif du génome de différentes espèces afin d'identifier des régions hautement conservées au cours de l'évolution, et donc susceptibles de comporter des séquences fonctionnelles importantes.

L'équipe américaine de Pennacchio et al et Groenendijk. (2001) s'est intéressée à la

région du cluster APOA1/C3/A4 sur le chromosome 11q23, région d'intérêt particulier dans le métabolisme des lipides. Ainsi, en comparant l'ADN génomique de l'homme et de la souris sur une région de 200 kb, ils ont identifié une séquence putative d'apolipoprotéine appelée apoAV.

Par ailleurs, l'étude de modèles animaux transgéniques puis les études d'association génétique chez l'homme ont montré l'implication de l'apoAV dans le métabolisme des TG.

II-2-Le gène APOA5

II-2-1 La structure du gène

Le gène de l'apoprotéine AV est situé approximativement à 27 kb en aval du gène APOA4 et à 37 kb du gène d'APOC3.

Le gène APOA5 humain se compose de 4 exons et 3 introns, code pour une Protéine de 369 acides aminés (Pennacchio LA, et al 2001) (figure 5)

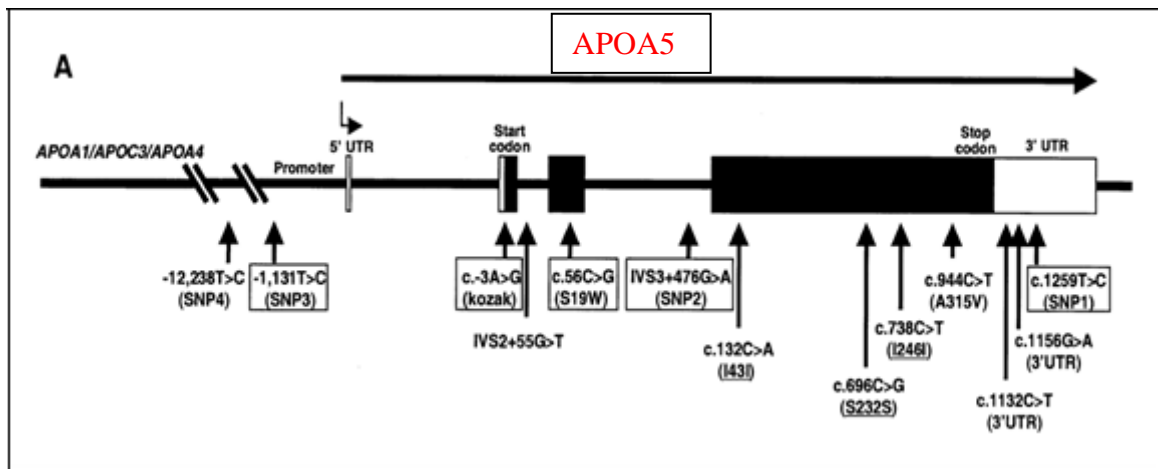


Figure 5: structure génomique de l'APOA5 et localisation des polymorphismes (Pennacchio et al., 2002).

II.2.2- Régulation de l'expression du gène:

L'apoA5 est régulé par plusieurs facteurs telles que les récepteurs nucléaires, l'insuline, le glucose et notamment les hormones thyroïdiennes.

- Régulation par les récepteurs nucléaires

Ce sont des récepteurs intracellulaires formant une large famille composée de plus de 150 protéines différentes. Parmi ces récepteurs nucléaires, 5 interviennent dans la régulation de l'apoA5: se sont PPAR α , FXR, LXR et SREBP-1c, ROR α , HNF-4 α .

- Régulation par l'insuline

Depuis la mise en évidence de l'association entre l'hyperinsulinémie et l'hypertriglycéridémie, plusieurs recherches sont réalisées pour déterminer si l'APOA5 est régulée par l'insuline.

L'insuline inhibe l'activité du promoteur de l'APOA5 de manière indirecte par l'inhibition de la liaison d'USF1/2 au promoteur par la voie Pi3 kinase: les formes phosphorylées d'USF1/2 perdent leur capacité de fixation et inhibe l'activité du promoteur de l'APOA5. (Nowak *et al.*, 2005)

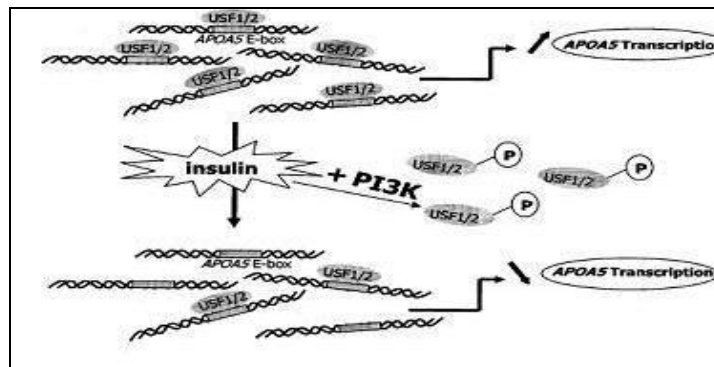


Figure 8: Rôles de l'USF1/2 dans la régulation de la transcription du gène

- Régulation par le glucose

Le glucose active indirectement la transcription du gène APOA5 en facilitant la liaison d'USF1/2 au promoteur par la voie PP1/PP2A: les formes déphosphorylées d'USF1/2 se fixent ensuite sur la 1ère E-Box et stimulent l'activité du promoteur de l'APOA5 (Nowak *et al.* 2008).

- Rôle des hormones thyroïdiennes

Prieur et *al.* (2005) ont montré que l'hormone thyroïdienne T3 et un ligand synthétique du récepteur thyroïdien β (TR β), stimulent l'expression du gène APOA5 et la synthèse de l'apolipoprotéine AV. Ils ont démontré que le récepteur thyroïdien régule directement le promoteur du gène APOA5 grâce à une région DR4 (Direct Repeat 4).

II-3. L'Apolipoprotéine A-V

II-3-1. Structure, expression tissulaire et distribution sur les lipoprotéines circulantes

L'APOAV est une protéine constituée d'une chaîne polypeptidique de 369 acides aminés, et possède une masse molaire moléculaire de 39 kDa (Van der Vliet HN et al 2002). Cette chaîne est organisée en une structure α hélicoïdale amphipathique à domaine multiple. Ceci suggère une liaison forte aux lipides. Ces régions α -hélicoïdales, séparées par des résidus proline. Elle présente 27 % d'identité avec l'apoAIV.

L'APOAV est synthétisée et exprimée principalement dans le foie et circule dans le plasma liée aux CM, VLDL et aux HDL.

Les concentrations plasmatiques d'apoA-V sont très faibles ($\mu\text{g/l}$ ou ng/l) et peuvent présenter des variations qui sont généralement dues aux origines ethniques variées des populations étudiées et les différentes techniques de dosage ELISA utilisées.

II-3.2. Mécanismes d'action de l'Apo A-V

Le taux des TG et celui de l'Apo A-V laisse penser à un rôle de cette protéine dans le métabolisme lipidique qui est impliqué dans le développement de syndrome métabolique. Des études montrent que le polymorphisme du gène de cette apolipoprotéine est associé à l'augmentation de la concentration plasmatique des TG et à l'augmentation du risque de MCV (Nowak et coll, 2008)

Les lipoprotéines riches en TG telles que les VLDL sont hydrolysées par l'action lipolytique du dimère LPL, qui est lié aux protéoglycanes de sulfate de héparane présent au niveau de l'endothélium vasculaire (figure 6).

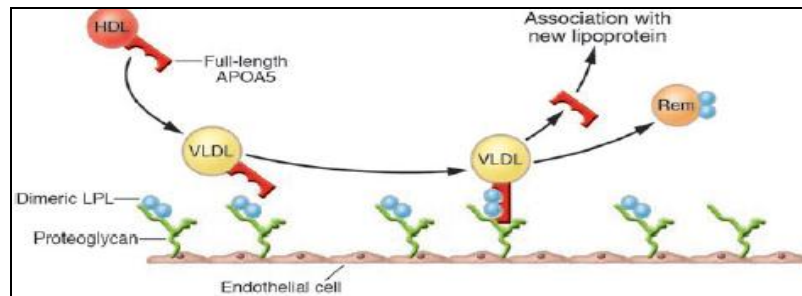


Figure 6: Hydrolyse des lipoprotéines riches en TG d'après (Merkel et Heeren, 2005)

L'Apo A-V réduit les TG plasmatiques selon trois mécanismes (Dick et al, 2006) (figure 7):

- ✚ Inhibition de la production des VLDL.
- ✚ Stimulation de l'hydrolyse des VLDL-TG par des LPL.
- ✚ Accélération de la capture hépatique des ramenant

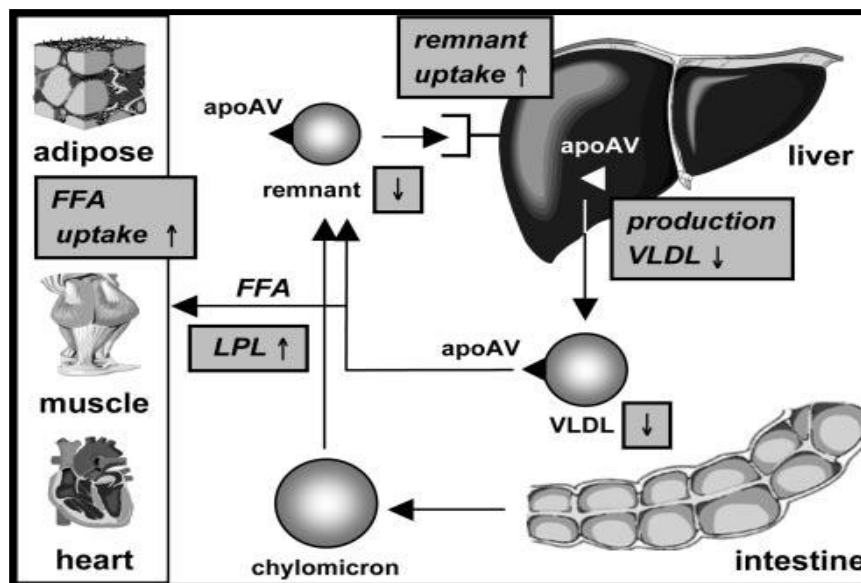


Figure 7: Les mécanismes proposés sous l'effet TG-abaissement des apoAV.

III-Étude des polymorphismes dans la population générale chez l'Homme

III.1-SNPS

SNPS ou polymorphisme nucléotidiques sont généralement définis comme une position d'une paire de bases simples (pb) dans l'ADN génomique définissant un allèle rare ou muté par opposition à l'allèle fréquent ou sauvage.

III.2- La mutation S19W ou 56C > G

La mutation 56C>G de l'*APOA5* est localisée dans l'exon 2 du gène : il en résulte une substitution d'une sérine (S) en tryptophane (W).

Le SNP S19W (ou 56C>G) est associés à l'augmentation de risque de SM et à une augmentation du taux des TG (*Olano-Martin et al., 2008*).

III.3- Les Haplotypes

Un haplotype est un ensemble de variations de l'ADN, ou des polymorphismes, qui ont tendance à être hérités. Un haplotype peut se référer à une combinaison d'allèles ou à un ensemble de polymorphismes de nucléotides simples (SNP) a constaté sur le même chromosome et à proximité les uns des autres.

Pour notre gène *APOA5* on définit trois haplotypes indépendants: *APOA5*1*, *APOA5*2*, *APOA5*3* définis par les allèles des 5 polymorphismes du gène. (*Pennacchio et al., 2002*).

- ***APOA5*1*** est l'haplotype sauvage, c'est-à-dire présentant les allèles fréquents de chacun des polymorphismes.

- ***APOA5*2*** est défini par la présence des allèles rares des polymorphismes SNP1, SNP2, -3A>G et -1131T>C. tous les polymorphismes étant en fort déséquilibre de liaison avec -1131T>C, -1131T>C peut servir de marqueur pour identifier l'haplotype *APOA5*2*.

- ***APOA5*3*** est défini par la présence de l'allèle rare du polymorphisme S19W.

IV-Étude de populations:

Dans la majorité des études, des allèles rares d'APOA5 ont été trouvés associés à une augmentation des TG chez les patients présentant le SM. Dans des populations d'origines caucasienne ou asiatique, plusieurs types de SNP associés ont été décrits : **-1131T>C** (*Maasz et al., 2007 ; Yamada et al., 2007*), **S19W**, **-3A>G** et **c-533G>T** (*Yamada et al., 2008*), **V153M** (*Grallert et al., 2007*), **c1259T>C** et **IVS3-476G>A** (*Kisfali et al., 2009*).

Yamada et ses collaborateurs montre que le polymorphisme -1131T>C est associé a la prévalence du SM chez des patients japonaise (*Yamada et al., 2007*), cette observation a été confirmée chez une population hongroise (*Maasz et al., 2007*)

Pour une population française, l'étude réalisée par Dallongeville et al (2008) incluant 932 personnes présentant le SM et 2206 témoins a montré que l'allèle 56G est associé a un risque élevé du SM

I – Echantillonnage

La collecte des échantillons a été effectuée auprès du service de biochimie médicale au centre de biologie médicale de l'Institut Pasteur de Casablanca. Le recrutement des patients (n= 35) et des témoins (n=31) a été réalisé après un consentement éclairé des patients et des témoins (annexe3).

Les échantillons de sang ont été prélevés par ponction veineuse après 10 à 12 heures de jeun comme suit :

- 5ml de sang ont été prélevés sur tubes EDTA (Acide Éthylène-Diamine-Tétraacétique) pour l'extraction d'ADN immédiate, ou congelés à -20°C pour une extraction ultérieure.
- 5ml sont prélevés sur tubes secs. Dans ce cas, le sang est centrifugé à 4000 tr/min à 4°C et pendant 10 minutes et le sérum est isolé pour réaliser le dosage des paramètres lipidiques.

II - Étude clinique

Un questionnaire a été standardisé pour tous les sujets. Les critères retenus pour la recherche des porteurs du SM sont les suivants:

Origine ethnique, âge, poids, taille, tabagisme, activité physique...etc. Pour classer ces échantillons (voir annexe 2), nous nous sommes basés sur les critères utilisés par la **Fédération Internationale du Diabète (IDF)** pour le diagnostic du syndrome métabolique.

III - Étude biochimique:

Les tests biochimiques effectués sont les suivants:

- Glycémie à jeun
- Triglycéride (TG)
- Cholestérol-Total (C-Tot)
- Cholestérol-LDL (C-LDL)
- Cholestérol-HDL (C-HDL)

Ces analyses ont été réalisées grâce à un automate (VITROS) à l'aide des kits spécifiques à base de chimie sèche pour chaque test.

IV- Étude moléculaire

IV.1- Extraction d'ADN génomique au phénol chloroforme

Les techniques d'extraction des acides nucléiques relativement simples, permettent d'obtenir un ADN de pureté élevée et de quantité importante. Elles ont pour but de récupérer les acides nucléiques en suspension et de les resolubiliser dans un tampon adéquat. Il convient simplement d'éviter toute destruction enzymatique ou mécanique.

a) Principe

Le principe de cette technique est basé sur la solubilité différentielle des molécules (acides nucléiques /contaminants) entre deux phases (aqueuse et organique) non miscibles.

Le phénol est un excellent agent dénaturant des protéines et il permet de séparer efficacement les protéines des acides nucléiques, il est ensuite éliminé par l'extraction avec du chloroforme. La phase aqueuse, qui contient les acides nucléiques, est ainsi récupérée après centrifugation.

b) Protocole expérimental

Préparation du culot blanc

Le sang total est soumis à une lyse complète des globules rouges par incubation pendant 10 mn à + 4°C près addition de deux volumes de Tris-EDTA (20 :5) (**annexe 1**). Après centrifugation à 5000 tr/min à 4°C pendant 15 min, le culot est remis en suspension dans le même tampon puis centrifugé dans les mêmes conditions. On répète ces opérations plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un culot blanc.

Lyse des globules blancs

Le culot obtenu est constitué essentiellement de leucocytes qui sont soumis à une lyse par l'addition de 2 mL de TE (10 :5) (annexe 1), 60µL de la protéinase K à 20 mg/mL et 300 µL de SDS à 10% (annexe 1). Le mélange est ensuite incubé à 56°C pendant une nuit entière.

Extraction au phénol – chloroforme

A un volume de préparation précédente, est ajouté un volume de phénol (annexe 1) saturé en Tris 0.5 M pH=7.6. L'ensemble est mélangé vigoureusement jusqu'à l'obtention d'une solution d'aspect crémeux. Une centrifugation à 6000 tr/min pendant 15 minutes à +20°C, permet de séparer deux phases : la phase supérieure aqueuse qui renferme les acides nucléiques, et la phase inférieure contenant les extraits cellulaires et les protéines. La phase aqueuse est récupérée dans un autre tube.

Un volume de chloroforme-alcool isoamylique (24:1) (annexe 1) est ajouté à la phase

aqueuse pour éliminer l'excès du phénol. Après centrifugation à 6000 tr/min pendant 15 minutes à +20°C, la phase supérieure aqueuse est récupérée.

Précipitation de l'ADN

On ajoute deux à trois volumes d'éthanol absolu conservé à -20°C aussi longtemps que possible à la préparation d'ADN. Après agitation douce jusqu'à obtention de la méduse, cette dernière est récupérée délicatement dans des tubes Eppendorf. Une fois séché à l'air libre ou sous la hotte, l'ADN est dissous dans 200 µL à 500 µL de TE (10 : 1).

c) Évaluation de la qualité et de la quantité de l'ADN extrait

L'intégrité de l'ADN est appréciée par une électrophorèse sur un gel d'agarose de 1 à 2%. L'ADN génomique s'il n'est pas dégradé, sera visible en lumière ultraviolette sous la forme d'une bande unique qui migre très lentement. A l'inverse, l'ADN dégradé apparaît sous forme d'une traînée

Le contrôle de la quantité d'ADN extrait après l'élimination de l'ARN par les ribonucléases consiste en un dosage spectrophotométrique, afin de déterminer sa concentration et sa pureté.

En effet, les acides nucléiques présentent un pic d'absorption dans l'ultraviolet à 260 nm, l'absorption à 280 nm correspond à celle des protéines. Si le rapport DO260 / DO280 est compris entre 1,8 et 2, l'ADN est considéré comme suffisamment débarrassé de protéines cellulaires.

Une dilution de l'extrait est préparée dans du TE 10 : 1 pour mesurer les DO à 260nm et à 280 nm. La concentration est déterminée selon la formule suivante :

$[ADN] \mu\text{g}/\text{mL} = DO_{260} \times 50 \times \text{facteur de dilution}$, sachant qu'une unité de DO correspond à 50 µg /mL d'ADN double brin.

IV.2- Amplification d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction)

a) Principe

L'une des propriétés de toutes les ADN polymérase est de synthétiser le brin

complémentaire à partir d'une amorce. Cette propriété est indispensable à la stabilité de l'information cellulaire, et elle est mise à profit dans la technique PCR, décrite par Mullis en 1985, pour amplifier par réplifications successives d'une séquence désirée.

La technique PCR permet l'amplification exponentielle d'une région spécifique d'un acide nucléique donné par l'utilisation d'une ADN polymérase thermostable, d'amorces et des quatre désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP). L'ensemble est soumis à une série de cycles de température afin d'obtenir une quantité suffisante de la séquence d'ADN désirée. L'amplification se déroule en plusieurs cycles comprenant chacun les étapes suivantes:

- **Une dénaturation** de l'ADN double brin par chauffage entre 90-95°C ;
- **Une hybridation** des amorces qui s'effectue à une température proche de la température de fusion (T_m) des amorces (40-70°C) ;
- **Une élongation** de l'ADN à partir de l'extrémité 3'OH libre de l'amorce dans le sens 5' → 3'. La durée de polymérisation dépend de la taille du fragment d'ADN à amplifier.

Le nombre de cycles est variable, généralement situé entre 25 et 35 cycles. La durée et la température des différentes étapes sont des paramètres spécifiques qui sont définis pour chaque expérience.

b) Les composantes d'une réaction PCR :

- **L'ADN matrice** : Les meilleurs résultats sont obtenus avec de l'ADN parfaitement purifié.

- **Le tampon de la Taq polymérase** : il sert à maintenir la stabilité et le pH du milieu réactionnel au niveau optimal pour l'activité de la Taq polymérase.

- **Les amorces sens et anti-sens** : ce sont des petites séquences d'ADN d'environ 20 bases. Elles sont capables de s'hybrider de façon spécifique grâce à la complémentarité des bases, leur extrémité 3'OH libre va servir d'amorce pour l'ADN polymérase. Les concentrations d'amorces habituellement utilisées sont comprises entre 0.2 et 0.8 μM .

- **Le chlorure de magnésium (MgCl_2)** : c'est l'élément clef de l'hybridation des amorces. L'hybridation des amorces dépend de la température et de la concentration ionique. En plus, c'est un cofacteur qui catalyse le fonctionnement de l'ADN polymérase. Les concentrations optimales sont en général comprises entre 0,5 et 2,5 mM.

- **Les dNTPs** : Ce sont les monomères de base utilisés par la Taq Polymérase pour synthétiser les brins d'ADN complémentaires.

- **La Taq polymérase (ou ADN polymérase)** : c'est une enzyme thermorésistante

extraite de la bactérie *Thermus aquaticus*. Elle est capable de résister à la température (+ 95°C) sans perdre son activité. Les quantités optimales d'enzyme sont comprises entre 1 et 2,5 unités.

IV.3- L'électrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse est une méthode permettant la séparation de particules chargées sous l'action d'un champ électrique uniforme.

A pH neutre, les molécules d'ADN sont chargées négativement du fait de la présence du phosphate, et migrent vers l'anode quand elles sont soumises à un champ électrique. Leur rapport charge/taille étant constant, ces molécules se séparent en fonction de la facilité avec laquelle elles progressent à travers les mailles constituées par le gel. La séparation est ainsi assurée par l'effet de la filtration du gel. La vitesse de la migration d'une molécule d'ADN dépend de deux paramètres : sa taille et la concentration en agarose du gel, mais le voltage et la force ionique du tampon interviennent aussi.

La solution d'ADN est ajoutée au tampon de charge contenant :

- ♦ Du glycérol qui permet d'augmenter la densité de la solution d'ADN à déposer dans le gel afin de pouvoir l'entraîner vers le fond du puits, cela évite à l'échantillon de remonter à la surface du tampon et donc de contaminer les autres puits.

- ♦ Marqueur de mobilité : c'est le bleu de bromophénol qui permet de visualiser la migration.

Enfin, la visualisation de l'ADN sur gel d'agarose est réalisée grâce à un colorant fluorescent, le Bromure d'Ethidium (BET). Ce composé possède la propriété de s'intercaler entre les paires de bases des acides nucléiques. La révélation se fait par exposition du gel d'agarose aux radiations UV. Les fragments d'ADN se présentent sous forme de bandes fluorescentes.

IV.4. Digestion enzymatique

Les enzymes de restriction sont capables de digérer l'ADN au niveau de séquences spécifiques appelées sites de restriction. Il existe, pour chaque enzyme, un tampon spécifique et une température pour lesquels l'activité est optimale.

La présence ou l'absence de site de restriction entraîne une variation de longueur des fragments. Cette variation de longueur de fragments peut être mise en évidence par une digestion enzymatique de l'ADN génomique suivie d'une électrophorèse sur gel de

polyacrylamide ou gel d'agarose.

Cette technique est utilisée lors de la mise en évidence des mutations 56 C>G et-12,238 T>C au niveau du gène Apo A-V

a) Recherche du polymorphisme 56 C>G:

Protocole expérimental

Le fragment du gène APOA5 contenant le SNP 56 C>G sera amplifié à une taille de 157pb. Pour l'amplification, nous avons utilisé deux amorces sens et anti-sens encadrant cette région cible :

- **L'amorce sens F :** 5'- GGC TCT TCT TTC AGG TGG GTCTCCG -3'
- **L'amorce anti-sens R :** 5'- GCC TTT CCG TGC CTG GGT GGT -3'

Le mélange réactionnel de 25 µL contient 8 µl d'ADN (12 ng/ µL), 2,5 µl du tampon de la PCR (10X), 2 µL de dNTP (2.5µM), 0.5 µL de chaque amorce F et R (20µM), 0.85 µL de MgCl₂ (50 µM) et 0.2 µL de Taq DNA polymérase.

La réaction PCR est effectuée dans les conditions suivantes : dénaturation initiale à 96°C pendant 5 min puis 30 cycles comprenant chacun une dénaturation à 96°C pendant 30s, une hybridation à 64°C pendant 30 s et une élongation à 72°C pendant 45 s et finalement une extension à 72°C pendant 10 min.

Après contrôle de l'amplification PCR par électrophorèse, une digestion enzymatique par la **Taq I** est réalisée.

La substitution C>G a pour conséquence la disparition du site de restriction Taq I.

La digestion du produit PCR est réalisée dans des tubes Eppendorf contenant 12µl du produit PCR de chaque échantillon, 0,1 µL de l'enzyme Taq I, 1,6 µL du tampon de l'enzyme, 2,7 µl de l'eau distillée stérile dans un volume final de 16 µL. le mélange réactionnel est incubé à 65°C pendant deux heures.

Le contrôle de la digestion se fait par électrophorèse sur gel d'agarose à 4%. En présence du SNP 56 C>G, nous obtiendrons deux bandes en présence de l'allèle C l'une à 134 pb et l'autre à 23pb. A l'inverse, en présence de l'allèle G une seule bande de 157pb est obtenue.

V- Étude statistique

Les différents calculs statistiques ont été réalisée par le logiciel STATA version 11.0 . L'équilibre d'Hardy Weinberg a été testé par le programme HWE2 version 2. Les associations alléliques et génotypiques ont été calculées par le programme CONTING

version 2,80. Les différences sont significatives si P valeur $< 0,005$

Dans cette partie, nous allons présenter nos résultats obtenus portant sur:

- * une analyse clinique (résultat du questionnaire)
- * une étude biochimique
- * une étude moléculaire

1- Analyse clinique

Comme nous l'avons signalé dans la partie matériels et méthodes, plusieurs paramètres ont été pris en considération lors de cette étude clinique : âge, poids, niveau d'étude, tabagisme, activité physique et surtout le tour de taille et de la hanche et la pression artérielle adoptés par la Fédération International du Diabète (FID). Les résultats de ces différents paramètres nous a permis de séparer cet échantillon en 2 groupes de personnes : le premier constitué de 35 personnes supposées porteurs du SM et 31 se sont révélés saines. Le tableau V résume l'ensemble des résultats obtenus dans cette étude.

Rappelons que, selon la FID les valeurs standard des 3 principaux paramètres sont :

- ***Tour de taille** : chez l'Homme ≥ 94 cm, chez la Femme ≥ 80 cm
- ***Pression artérielle** : Systolique ≥ 130 mmHg , Diastolique ≥ 85 mmHg
- ***HDL-C** $< 1,03$ mmol/l (H) $< 1,29$ mmol/l (F) **Et TGY** $> 1,7$ mmol/l

L'analyse de ces résultats montre l'absence d'une différence significative entre les patients et les témoins pour les paramètres suivants : l'âge, poids, taille, tabagisme. Tandis que les autres paramètres montrent une différence significative entre les deux groupes, en particulier le tour de taille ($<0,0001$), tour de hanche ($P = 0,0021$) et pression artérielle ($P_{sys}=0,0012$, $P_{dias}=0,0072$).

Tableau IV: Distribution des sujets étudiés selon les paramètres cliniques (valeurs moyenne ou %).

	Témoin	Patients (SM)	P value (<0,05)
Le nombre (%)	31 (46,97)	35 (53,03)	
Sexe (F/H)	15/16 (48,39/51,61)	8/27 (22,86/77,14)	0,03
Age	49 ±9,29	52,94 ±7,30	0,058
Poids	68,64 ± 9,93	80,94 ±14,61	0,062
Taille	168 ± 9,63	165,2 ± 8,34	0,2
TT	79,25 ± 11,54	100,32 ±11,00	<0,0001
TH	97,74 ± 18,66	111,94 ± 17,31	0,0021
PA sys	11,99 ± 1,63	13,50±1,95	0,0012
PA dias	7,91 ± 1,20	8,9 ± 1,61	0,0072
Niveau d'étude			
Analphabète		4 (11,43)	
Coranique		1 (2,86)	
Primaire	10 (32,26)	3 (8,57)	0,005
Secondaire	21 (67,74)	18 (51,43)	
Universitaire		9 (25,71)	
Tabagisme			
Non fumeur	26 (83,87)	29 (82,86)	
Ex fumeur	3 (9,68)	5 (14,29)	0,68
Fumeur	2 (6,45)	1(2,86)	
Activité physique	5 (16,13)	14 (40,00)	
	26 (83,87)	21 (60,00)	0,03

2- Analyse biochimique

Dans cette étude, nous avons déterminé différents paramètres biochimiques en se basant sur le principe de la chimie sèche, grâce à l'automate VITROS. Parmi ces paramètres : les TG plasmatiques, le C-HDL, le C-Total, le C-LDL et la glycémie à jeun.

Pour chacun de ces 5 paramètres, nous avons calculé et comparé sa moyenne dans les deux groupes. Le tableau V présente les résultats obtenus:

Tableau V: comparaison des paramètres biochimiques chez les sujets étudiés (valeurs moyenne \pm SD)

	Témoins	Patients (SM)	P (<0,05)
Triglycérides plasmatiques (g/L)	1,00 \pm 0,42	1,56 \pm 0,67	<u>0,0001</u>
C-HDL (g/L)	0,54 \pm 0,26	0,53 \pm 0,12	0,82
C- Total (g/L)	1,84 \pm 0,64	1,89 \pm 0,26	0,63
C-LDL(g/L)	1,32 \pm 0,48	1,16 \pm 0,24	0,09
Glycémie à jeun (g/L)	1,40 \pm 0,66	0,96 \pm 0,45	<u>0,0021</u>

D'après les résultats obtenus, nous avons remarqué qu'il n'y a pas de différence significative entre les témoins et les patients pour (HDL, LDL, et Cholestérol total). En revanche, les paramètres (TG et Gly) présentent une différence très significative entre le groupe témoin et les patients présentant le syndrome métabolique : **Triglycérides plasmatiques (g/L)= 0,0001, Glycémie à jeun (g/L)= 0,0021.**

3- Analyse moléculaire

L'objectif de cette partie de notre travail est de rechercher sur 66 échantillons (35 présentant le syndrome métabolique et 31 témoins) s'il existe une association entre le polymorphisme **56 C>G** (mutation localisée dans le gène APOA5 au niveau de l'exon 2) et le niveau élevé des triglycérides observé chez les patients atteints du SM comme nous l'avons signalé dans le tableau V. Cette analyse moléculaire consistera en une extraction d'ADN à partir des globules blancs des deux groupes suivie d'une amplification par PCR, et une

digestion enzymatique.

Sur les 66 personnes étudiées, Nous n'avons présenté que les résultats obtenus à partir de 8 dont (1-4 présentant le SM, 5-8 témoins)

✓ L'amplification par PCR

Cette technique nécessite l'utilisation des amorces spécifiques pour le gène APOA5, suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose à 2%.

La figure (8) représente l'électrophorèse des produits PCR des 8 personnes étudiées. Le résultat obtenu est un fragment de 157 pb, correspondant au fragment recherché.

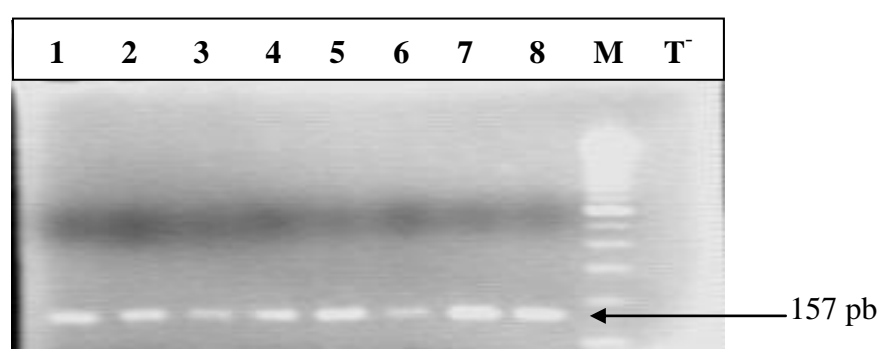


Figure 8: Profil électrophorétique des produits PCR du gène APOA5 (56C>G)
(M: Marqueurs de taille (100 pb); T: Témoin négatif)

✓ La digestion enzymatique:

La digestion du produit PCR par l'enzyme de restriction *TaqI*, suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose à 3%, permet d'obtenir 3 profils (*figure 9*):

➤ Homozygotes C : la digestion donne deux fragments: l'un de 134 pb et l'autre de 23 pb : c'est le cas de la plupart des patients (1, 3, 5, 6, 7, 8)

➤ Homozygote G: pas de digestion. Un seul fragment de 157 bp, profil trouvé pour le patient 4.

➤ Hétérozygote CG: la digestion donne 3 fragments de 157 pb, 134 pb et 23 pb: c'est le cas du patient 2.

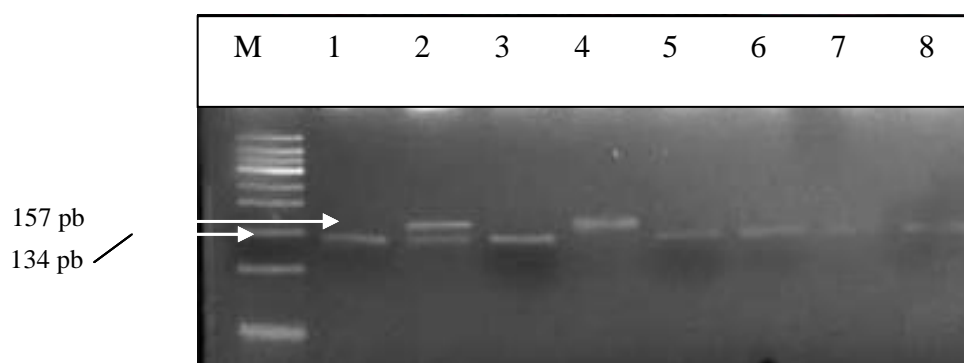


Figure9: Profil électrophorétique des produits PCR digérés par l'enzyme *Taq I*
(M: Marqueur de taille (100 pb); (1-8): Patients)

Le profil de la digestion par l'enzyme de restriction *Taq I* a montré l'existence de trois génotypes: selon *Pennacchio et al.(2002)*, le génotype GG (W19) est associé à des taux élevés de TG plasmatiques, ce qui est le cas pour le patient 4 (figure9).il s'agit d'une femme, qui présente un taux élevé en TG (201mg/dl), un taux faible en c-HDL (44mg/dl) et une hyperglycémie à jeun (129mg/dl).

✓ **Association génotypique:**

Tableau VI: Distribution des différents génotypes chez les deux groupes.

Les génotypes Les cas	CC	GG	CG	PV	X ²
SM	19	6	10	0,045	6,20
T	18	0	13		

D'après les données de ce tableau, nous avons remarqué que les sujets étudiés présentent une variation allélique pour le polymorphisme 56C>G. Nous avons constatons que sur les 35 sujets patients, 19 sont homozygotes C, 10 hétérozygotes CG et 6 homozygotes G. tandis que les témoins présentent des valeurs sensiblement égale pour les cas homozygote C et hétérozygote CG et absence des cas homozygote G (zéro).

✓ **Association allélique**

Le tableau VII regroupe l'ensemble des résultats. Ils nous montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les différentes fréquences alléliques chez les deux groupes ($p \text{ value} = 0.33 > 0.05$).

Tableau VII: association des allèles C et G chez les deux groupes.

Les allèles Les cas	G	C	PV	X ²	OR	IC
SM	11	24	0,33	0.92	1,67	[0,56-4,99]
T	6,5	24,5				

Discussion

Le syndrome métabolique est en train de devenir un problème de santé publique au niveau mondial ainsi qu'au Maroc.

L'apolipoprotéine AV joue un rôle important dans le métabolisme des lipides riches en triglycérides (LRTG), surtout dans leur catabolisme, en stimulant leur lipolyse par l'augmentation de l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL).

Notre objectif dans cette étude était d'identifier le polymorphisme **56 C > G** d'APOA5 qui est probablement associé à l'augmentation du risque du Syndrome Métabolique chez une population marocaine.

L'analyse de nos résultats cliniques montrent qu'il y a des différences significatives de certains paramètres étudiés entre le groupe des témoins et celui des patients qui ont le syndrome métabolique, notamment : le sexe ($P=0,03$), le TT ($P=0,0001$), le TH ($P=0,021$), la PA sys ($P=0,0012$), la PA dias ($P=0,0072$), l'activité sportive ($P=0,0021$) et le niveau d'étude ($P=0,005$). Par contre, les autres paramètres tels que l'âge, le poids, la taille et le tabagisme ne présentent aucune différence significative.

Ces mêmes résultats ont été trouvés dans les études de Dallongeville (*Dallongeville et al, 2008*), pour les paramètres suivants: la PA ($P<0,0001$), l'activité sportive ($P<0,0001$) et le niveau d'étude ($P<0,0001$) qui présentent une différence significative, et les études de Yamada (*2007*) pour les paramètres sexe ($P<0,001$) et PA ($P=0,001$).

Par contre, les résultats des autres paramètres montrent qu'il y a une différence

significative entre l'âge ($P < 0,0001$), et le tabagisme ($P = 0,03$) chez les deux groupes (*Yamada et al, 2007*).

Ainsi, en analysant nos résultats biochimiques, nous avons trouvée :

*une différence significative du taux des TG ($P = 0,0001$) et de la glycémie à jeun ($P = 0,0021$) chez les deux groupes, ce qui est confirmé par les différentes études de Dallongeville, Yamada et Kisfali (*Kisfali et al., 2009, Dallongeville et al, 2008 Yamada et al., 2007*).

* aucune différence significative pour les autres paramètres : le C-Tot, le C-HDL et le C-LDL, ce qui est confirmé par les études de Ksifali et non par les deux autres équipes de Dallongeville et Yamada.

Par ailleurs, les résultats de notre étude moléculaire nous a laissé penser que, parmi les génotypes trouvés, seul l'homozygote G serait associé à la présence du Syndrome Métabolique ($p = 0,045 < 0,05$). Or, nous avons constaté une absence d'association allélique ($p = 0,33 > 0,005$) ce qui nous a pas permis de confirmer l'association du polymorphisme 56C>G ni à l'augmentation, ni à la diminution du risque du Syndrome Métabolique. Ces mêmes résultats ont été trouvés dans les études de Kisfali et Yamada (*Kisfali et al., 2009, Yamada et al., 2007*).

En revanche, Dallongeville *et al.*, (2008) a trouvé une association de ce polymorphisme au syndrome métabolique. Ces mêmes auteurs ont montré qu'il y a une association génotypique GG avec l'augmentation des taux des TG sériques, découverte pour la première fois par Pennacchio *et al.* (2002), ainsi il y a une différence significative entre les témoins et les patients (*Dallongeville et al., 2008 ; Grallert et al., 2007*).

A la lumière des résultats de notre travail et ceux des autres équipes de recherche, nous avons constatée qu'il y a une différence surtout sur le plan génétiques et en particulier sur l'association alléliques. Cette discordance peut être expliquée par la taille de la population sur laquelle nous avons mené notre étude: le nombre des sujets recrutés est insuffisant (66 contre 3138 (*Dallongeville et al., 2008*)).

CONCLUSION ET PERSPECTIVE

Actuellement, le Syndrome Métabolique constitue un enjeu épidémiologique et un problème de santé publique majeur à l'échelle mondiale. Il menace certaines catégories sociales comme les diabétiques, les hypertendus et les obèses, puisqu'ils présentent un facteur de risque pour le développement de ce syndrome.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés de chercher l'association des différentes SNP du gène *APOA5* avec l'augmentation des TG plasmatiques, ainsi que leur implication dans le développement du Syndrome Métabolique.

Ce travail est considéré comme une contribution à l'étude des polymorphismes de l'APOAV, notamment le SNP *56C>G*, et leur association au Syndrome Métabolique chez une population marocaine (patients et témoins)

Pour compléter cette étude il serait intéressant de:

- ✓ De finaliser l'étude du polymorphisme *56C >G* pour le reste des sujet recrutés,
- ✓ De rechercher d'autres SNP au niveau du gène *APOA-5*,
- ✓ Cribler d'autres mutations au niveau de tout le cluster *APO AI/CIII/AIV*, ce qui permettra de déterminer l'effet de synergie avec le polymorphisme de l'*APOA-V*.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUES

- **Acton S., Rigotti A., Landschulz K.T., Xu S., Hobbs HH., Krieger M.,** Identification of scavenger receptor SR-B1 as a high density lipoprotein receptor. *Science*, **1996**;271: 518-520
- **Andreelli F, Jacquier D.** Place du foie dans le métabolisme des lipoprotéines. *Hépatogastro*, **2006**, 3:185-190.
- **Alborn WE, Sloan HJ, Ulmer M, Peter J. O'Brien, William E. Amechand Boodhoo, Michael D. Knierman, Albert E. Schultze and Robert J. Konrad.** The novel apolipoprotein A5 is present in human serum, is associated with VLDL, HDL, and chylomicrons, and circulates at very low concentrations compared with other apolipoproteins. *Clin Chemistry*, **2005**, 51: 351–9.
- **Bertal Filali .K ., Bertal Filali .K ., Labaq. A., al, Khatouri. A.** Prévalence et caractéristiques du syndrome métabolique chez les cardiaques. *Diabetes & Metabolism* **2010**. 36:A52
- **Dallongeville J, Cottel D, Wagner A., Ducimetière P., Ruidavets J., Arveiler D., Bingham A., Ferrières J., Amouyel P and Meirhaeghe A.,** The APOA5 Trp19 allele is associated with metabolic syndrome via its association with plasma triglycerides. *BMC Medical Genetics*, **2008**. 9: 84.
- **Duvnjak. I, Duvnjak .m.,** the metabolic syndrome an ongoing story. *physiology and pharmacology* **2009**.7: 19-24
- **El Ayachi, Mohammed, Mohamed Mziwira, Lairon Denis, and Belahsen Rekia.,** Prevalence of parameter indicators of obesity and its relationship with metabolic syndrome in urban Moroccan women. *American journal of human biology: the official journal of the Human Biology*, **2008**. 4: 484-6.
- **Ford, ES, Wayne H Giles, and William H Dietz.,** Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, **2002**,3: 356-9.
- **Fruchart-Najib J., , Baugé E., Niculescu LS., Pham T., Thomas B., Rommens C., Majd Z., Brewer B., Pennacchio LA., Fruchart JC.,** Mechanism of triglyceride lowering in mice expressing human apolipoprotein A5. *Biochem. Biochem Biophys Res Commun*. **2004**. 319:397–404.

- **Grallert H.,** Sedlmeier EM., Huth C., Kolz M., Heid IM., Meisinger C., Herder C., Strassburger K., Gehringer A., Haak M., Giani G., Kronenberg F., Wichmann HE., Adamski J., Paulweber B., Illig T., Rathmann W.. **APOA5 variants and metabolic syndrome in Caucasians. Journal of Lipid Research, 2007, 48:2614-2621.**
- **Groenendijk M., Cantor RM., de Bruin TW., Dallinga-Thie GM.,** The apoAI-CIII-AIV gene cluster. *Atherosclerosis*, **2001**, 157: 1-11. .
- **Ishihara M., Kujiraoka T., Iwasaki T., Nagano M., Takano M., Ishii J., Tsuji M., Ide H., Miller IP., Miller NE., Hattori H.,** A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for human plasma apolipoprotein A5 concentration. *Journal of Lipid Research*, **2005**,46: 2015-2022
- **Kisfali P, Mohas M, Maasz A., Polgár N, Hadarits F, Markó L, Brasnyó P, Horvatovich K, Oroszlán T, Bagosi Z, Bujtor Z, Gasztonyi B, Rinfel J, Wittmann I, Melegh B.** Haplotype analysis of the apolipoprotein A5 gene in patients with the metabolic syndrome. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, **2009**, 5:1-7.
- **Lagrost L, Masson D, Chapman J.** Lipoprotéine et métabolisme lipidique. *Nouvelle Société Française Athérosclérose*, **2003**, pp. 1-11.
- **Maasz A, Kisfali P., Horvatovich K., Mohás M., Markó L., Csöngéi V., Faragó B., Járomi L., Magyar L., Sáfrány E., Sipeky C., Wittmann I., Melegh B.** Apolipoprotein A5 T-1131C variant confers risk for metabolic syndrome. *Pathology Oncology Research*, **2007**.13: 243-247.
- **Merkel M., Loeffler B., Kluger M.,** Apolipoprotein A5 accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. *Journal of Biological Chemistry*, **2005**, 280:21553-21560.
- **Merkel M, Heeren J.** Give me A5 for lipoprotein hydrolysis. *Journal of Clinical Investigation*, **2005**,.115:2694-2696.
- **Nowak M., Helleboid-Chapman A, Jakel H, Moitrot E, Rommens C, Pennacchio LA, Fruchart-Najib J, Fruchart JC.**Glucose regulates the expression of the apolipoprotein A5 gene. *Journal of Molecular Biology*, **2008**, 380 :789-798
- **Olano-Martine E, Abraham AC, Gill-Garrison R.,** Influence of Apo A5 gene variants on postprandial triglyceride metabolism: impact of gender. *Journal of Lipid Research*, **2008**, 49,:945-953.
- **Olofsson, S.O ., Gill-Garrison R, Valdes AM, Grimaldi K, Tang F, Jackson KG, Williams CM, Minihane AM.** ApoA-V: the regulation of a regulator of plasma triglycerides.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **2005**;25:1097–1099.

- **Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA., Cohen JC, Cox DR, Fruchart JC, Krauss RM, Rubin EM.** An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science*, **2001**,. 294:169-173.

- **Phillips C, Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F., McManus R, Roche HM.** Genetic and nutrient determinants of the metabolic syndrome. *Current Opinion in Cardiology*, **2006**, 21:185-193.

- **Pruneta-Deloche V, Ponsin G, Groisne L., Fruchart-Najib J, Lagarde M, Moulin P.** Postprandial increase of plasma apoA5 concentrations in type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis*, **2005**,181:403-405

- **Reaven GM.** Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, **1988**.37:1595-1607.

- **Rguibi, Mohamed, and Rekia Belahsen.** Metabolic syndrome among Moroccan Sahraoui adult Women. *American journal of human biology: the official journal of the Human Biology Council* 16, **2004**. 5: 598-601

- **Rguibi, Mohamed, and Rekia Belahsen.** High blood pressure in urban Moroccan Sahraoui women. *Journal of hypertension* 25, **2007**. 7: 1363-8.

- **Schaap, F.G., Rensen PC, Voshol PJ, Vriens C, van der Vliet HN, Chamuleau RA, Havekes LM, Groen AK, van Dijk KW.** ApoA-V reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein- triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis. *J. Biol. Chem* **2004**. 279:27941–27947

- **Van der Vliet HN, Schaap FG, Levels JH., Ottenhoff R, Looije N, Wesseling JG, Groen AK, Chamuleau RA.** Adenoviral overexpression of apolipoprotein A-V reduces serum levels of triglycerides and cholesterol in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. **2002**; 295:1156 –1159.

- **Van der Vliet HN, Sammels MG, Leegwater AC., Levels JH, Reitsma PH, Boers W, Chamuleau RA.** Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration. *Journal of Biological Chemistry*, **2001**.276:44512-44520

- **Van der Vliet HN, Schaap FG, Levels JH, Ottenhoff R., Looije N., Wesseling JG., Groen AK., Chamuleau RA** .Adenoviral overexpression of apolipoprotein A-V reduces serum levels of triglycerides and cholesterol in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2002**,295:1156-1159.

- **Weinberg R.B., Cook VR., Beckstead JA., Martin DD., Gallagher JW., Shelness**

GS., Ryan RO. Structure and interfacial properties of human apolipoprotein A-V. *J. Biol.Chem.* **2003**, 278:34438–34444

- **Yamada Y, Kato K, Hibino T., Yokoi K, Matsuo H, Segawa T, Watanabe S, Ichihara S, Yoshida H, Satoh K, Nozawa Y.** Prediction of genetic risk for metabolic syndrome. *Atherosclerosis*, **2007**, 191: 551-558.

- **Yamada Y., Ichihara S., Kato K., Yoshida T., Yokoi K., Matsuo H., Watanabe S., Metoki N., Yoshida H., Satoh K., Aoyagi Y., Yasunaga A., Park H., Tanaka M., Lee W., Nozawa Y.** Genetic risk for metabolic syndrome: examination of candidate gene polymorphisms related to lipid metabolism in Japanese people. *Journal of Medical Genetics*, **2008**, 45: 22-28.

- **Zhao SP., Hu S., Li J., Li J., Hu M., Liu Q., Wu LJ., Zhang. T.** Association of human serum apolipoprotein A5 with lipid profiles affected by gender. *Clinica Chimica Acta*, **2007**, 376:68-71.

ANNEXE 1

Solutions et tampons

- **EDTA (Ethyle-diamine-tétraacétate) 0,5M :**
 - Dissoudre 93.05 g d'EDTA dans 400 mL d'eau distillée .
 - Agiter vigoureusement en ajustant le pH à 8 avec de NaOH 10N.
 - Ajuster le volume final à 500 mL .
 - Aliquoter et autoclaver.
- **Tris- base 1M :**
 - Dissoudre 121,1 g de Tris-base dans 800 ml d'eau distillée
 - Ajuster le pH à 7,6 avec H Cl 12N.
 - Compléter à 1 litre, aliquoter et autoclaver.
- **NaOH 10N (Hydroxyde de sodium):**
 - 400 g de NaOH, ajouter 600 mL d'eau distillée, bien agiter
 - Ajuster le volume final à 1 L.
- **TE 20/5 : Tris 20mM/ EDTA 5mM**
 - 20ml de Tris 1M pH = 7,6.
 - 10ml d'EDTA 0,5M pH = 8.
 - Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.
- **TE 10/5 : Tris 10Mm /EDTA 5mM**
 - 10ml de Tris 1M pH = 7,6.
 - 10ml d'EDTA 0,5M pH = 8.
 - Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.
- **TE 10/1 : Tris 10 mM / EDTA 1 mM :**
 - 10ml de Tris 1M pH = 7,6.
 - 2ml d'EDTA 0,5M pH = 8.
 - Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.
- **SDS 10% (Sodium-dodecyl-sulfate) :**
 - Dissoudre 100 g de SDS dans 900 ml d'eau et chauffer à 68°C
 - Ajuster le pH à 7,2
 - Ajuster le volume à 1 litre et stocker à température ambiante.
- **Phénol :**

- Mettre le flacon contenant le phénol cristallisé dans un bain marie à 65°C.
- Ajouter un volume de Tris 0,5 M pH 8 laisser sous agitation pendant 30 minutes et laisser décanter
- Prélever à l'aide d'une micropipette la phase aqueuse supérieure.
- Ajouter un volume égal de 0,1 M Tris-HCl à pH8.
- Agiter pendant 15 minutes, et laisser décanter.
- Enlever la phase aqueuse, mesurer le pH de la phase phénolique à l'aide du papier pH.
- Refaire les étapes 4,5 et 6 jusqu'à ce que le pH du phénol soit égal à 8.
- Une fois le phénol est équilibré, ajouter 0,1 M de Tris-HCl pH=8.
- Stocker à +4°C à l'abri de la lumière.
- ***Chloroforme alcool isoamylique 24/1 :***
 - 240 mL de chloroforme.
 - 10 mL d'alcool isoamylique.
- ***TAE (Tris Acide acétique EDTA) 50X :***
 - Dissoudre 242 g de Tris dans 500 mL de l'eau distillée.
 - Ajouter 100 mL de Na₂EDTA 0,5M (pH=8) et 57,1ml d'acide acétique.
 - Ajuster le volume à 1L avec de l'eau distillée.
- ***Tampon de charge :***
 - Bleu de bromophénol (BBP) 12,5 mg
 - Xylène Cyanol 12,5 mg
 - Glycérol 30 % 1,5 mL
 - Compléter à 10ml avec de l'eau distillée stérile.
- ***BET (Bromure d'éthidium) 10 mg/ml :***
 - Ajouter à 1g de BET dans 100 ml d'H₂O, bien agiter
 - Couvrir le flacon avec du papier aluminium
 - Stocker à température ambiante

-Annexe 2 -

QUESTIONNAIRE

Caractéristiques du patient	Référence IPM	Date
Nom et prénom :		/ /
Adresse:		
Tel :		

PARAMÈTRES CLINIQUES

Paramètres	Observations
pathologies :	Goitre oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/>
	Nodule oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/>
	Insuffisance rénale oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/>
	Hépatites oui <input type="checkbox"/> B , C non <input type="checkbox"/>
	Traité <input type="checkbox"/> Durée non traité <input type="checkbox"/>
Origine	
Sexe	Homme <input type="checkbox"/> femme <input type="checkbox"/>
niv d'étude	Coranique <input type="checkbox"/> Primaire <input type="checkbox"/> secondaire <input type="checkbox"/> universitaire <input type="checkbox"/>
Profession	
Age	[] années
Poids	[] Kg
Taille	[] cm
TT	[] cm
TH	[] cm
IMC	[] cm
Taille/TH	[] cm
PA	[/] mmHg
Tabagisme	Non fumeur <input type="checkbox"/> , ex fumeur <input type="checkbox"/> , fumeur <input type="checkbox"/> , nbr de cig/j:
Activité physique	Aucune <input type="checkbox"/> , légère <input type="checkbox"/> , intense <input type="checkbox"/> Type d'activité : Durée :

Antécédants	Familiaux: oui <input type="checkbox"/> , IM <input type="checkbox"/> , Angot <input type="checkbox"/> , HTA <input type="checkbox"/> , D <input type="checkbox"/> , Dyslipidémies <input type="checkbox"/> lien de parenté : age : , mort : oui <input type="checkbox"/> , non <input type="checkbox"/> , pas d'antécédants familiaux : <input type="checkbox"/> Médicaux: oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> , type de maladie traité : Chirurgicaux: oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/>				
Prises Médicamenteuses	HTA <input type="checkbox"/>	Dyslipidémies <input type="checkbox"/>	diabète <input type="checkbox"/>	Obésité <input type="checkbox"/>	Autres <input type="checkbox"/>
Commentaires:					

Résumé

D'une manière générale, le Syndrome Métabolique est considéré comme le facteur inducteur des maladies cardiovasculaires chez les populations.

Les concentrations des triglycérides plasmatiques reflètent une interaction complexe entre de multiples facteurs génétiques et environnementaux ce qui présentent un facteur de risque pour le développement de ce syndrome. L'apolipoprotéine A-V exerce un rôle majeur dans l'homéostasie des triglycérides.

Plusieurs équipes ont découvert chez différentes populations que le polymorphisme du gène *APOA5*, notamment le SNP 56 C>G associé à l'augmentation du risque du syndrome métabolique.

Notre objectif dans ce travail est d'étudier le polymorphisme 56 C>G du gène *APOA5* chez une population marocaine et de déterminer son association au syndrome métabolique par des études:

✓ Clinique, sur (35 patients et 31 témoins) selon les critères recommandés par la Fédération Internationale du Diabète (IDF). Cette étude consiste à l'élaboration d'un questionnaire standard, et la réalisation des tests biochimiques (Glycémie à jeun, TG, C-Total, C-LDL, C-HDL). La comparaison des différents paramètres cliniques et biochimiques a montré une différence significative entre les deux groupes telle que le tour de taille ($P < 0,0001$), la pression artérielle systolique ($P = 0,0012$), la pression artérielle diastolique ($P = 0,0072$) et le taux des Triglycérides ($P = 0,0001$).

✓ Moléculaire, consacrée à la recherche du polymorphisme 56C>G, réalisée par la méthode PCR- RFLP dans tous les échantillons. Nous avons trouvé comme résultat 3 profils pour le SNP 56 C>G :

35 Patients (18 CC, 10 CG et 6GG) ,31 témoins (18 CC, 13CG et 0 GG) avec une différence significative dans l'association génotypique ($P = 0.045 < 0,05$) entre les 2 groupes mais pas une association allélique ($P_v = 0,33 > 0,05$).

Nos résultats montrent qu'il semblerait que le Syndrome Métabolique est associé génotypiquement avec GG, mais pas alléliquement, ce qui ne permet pas d'affirmer cette association.

Il serait intéressant de déterminer l'association entre les paramètres cliniques, biochimiques et génétiques chez un nombre beaucoup plus important d'individus, d'où l'intérêt d'élargir cette étude.