



HAL
open science

Etude génétique du contrôle glycémique

Amélie Bonnefond

► **To cite this version:**

Amélie Bonnefond. Etude génétique du contrôle glycémique. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2010. Français. NNT : 2010LIL2S050 . tel-00590624

HAL Id: tel-00590624

<https://theses.hal.science/tel-00590624>

Submitted on 4 May 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DU DROIT ET DE LA SANTÉ DE LILLE
FACULTÉ DE MÉDECINE

Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille

**Thèse Présentée en Vue de l'Obtention du Titre de Docteur en Sciences
de la Vie et de la Santé**

Spécialité : Génétique Humaine

Amélie Bonnefond

Etude Génétique du Contrôle Glycémique

Thèse dirigée par le Docteur Martine Vaxillaire

Date de soutenance : le 7 Décembre 2010

Jury :

Mme le Professeur Anne Vambergue	Examineur, Présidente du Jury
M. le Professeur Xavier Jeunemaître	Rapporteur
M. le Docteur Raphaël Scharfmann	Rapporteur
Mme le Docteur Alexandra I. Blackemore	Examineur
M. le Professeur Philippe Froguel	Examineur
Mme le Docteur Martine Vaxillaire	Directrice de thèse

Je remercie chaleureusement le Pr. Xavier Jeunemaître et le Dr. Raphaël Scharfmann d'avoir accepté de juger ce travail et de faire partie de mon jury de thèse.

Un grand merci également au Pr. Anne Vambergue et au Dr. Alexandra Blackemore d'avoir accepté d'être membre de mon jury.

Cette thèse est le fruit d'un travail de réflexion, de recherche et d'expérimentation qui a pu se développer grâce à un ensemble de personnes que je tiens à remercier tout particulièrement :

*Martine Vaxillaire, ma directrice de thèse
Philippe Froguel, directeur de l'unité et co-encadrant
David Meyre
Nabila Bouatia-Naji
Emmanuel Vaillant
Aurélie Dechaume
Stéphane Lobbens
Marianne Deweirder
Christine Calvacanti-Proença
Jérôme Delplanque
Vincent Vatin
Christian Dina
Robert Sladek
Romano Regazzi
Michel Polak
Gwen Lomberk
Raul Urrutia
Guillaume Charpentier
Et Nathalie Clément.*

Cette thèse est dédiée à mes parents, mon frère, ma sœur et à mon Petit Prince.

Résumé

Le diabète de type 2 (DT2) est considéré aujourd'hui comme un problème de santé publique majeur responsable d'une morbidité et mortalité précoces avec une prévalence planétaire en constante augmentation. Bien que le DT2 soit parfois considéré comme évitable, il est généralement irréversible et les traitements actuels sont communément inefficaces pour stopper la progression inexorable de la maladie vers un mauvais contrôle glycémique et des complications dégénératives micro- et macrovasculaires.

Le DT2 est caractérisé par une altération de la sécrétion d'insuline par les cellules beta pancréatiques, combinée à une absence de réponse des organes cibles à l'insuline (insulino-résistance) incluant le foie, le tissu adipeux et le muscle squelettique. Malgré 40 ans de recherches intensives, les mécanismes moléculaires sous-jacents sont toujours largement débattus à ce jour. Le DT2 est une maladie à forte composante génétique, comme l'ont montré les études de jumeaux concordants pour le DT2. Au moins 2% des patients atteints de DT2 ont un diabète d'origine monogénique, survenant en général pendant l'enfance ou l'adolescence. L'une de ces formes survient spécifiquement à la naissance (diabète néonatal) et 50% de ses étiologies génétiques sont connus à ce jour. Les formes communes de DT2 survenant chez l'adulte sont polygéniques, liées à l'interaction entre des variants génétiques à effet modeste et faible pénétrance, et l'environnement ; en outre, des mécanismes « épigénétiques » seraient aussi en cause.

L'identification des déterminants génétiques du DT2 a été dopée par les études d'association pangénomique (GWAS pour *Genome Wide Association Studies*) grâce à la mise au point de puces à ADN, qui permettent d'analyser conjointement plusieurs centaines de milliers de polymorphismes nucléotidiques simples (SNPs pour *Single Nucleotide Polymorphisms*) chez plusieurs centaines de milliers d'individus. Les GWAS ont permis d'identifier à ce jour une trentaine de gènes associées au risque de DT2. Le diagnostic du DT2 repose sur la mesure d'un trait continu, la glycémie à jeun. A partir de 1,25g/l, un individu est considéré diabétique. La glycémie à jeun, même chez des personnes non diabétiques, est fortement héritable, c'est-à-dire que ce paramètre métabolique est sous contrôle génétique. Nous avons ainsi utilisé la méthode des GWAS pour rechercher des loci régulant la glycémie dans des populations générales comme la population française DESIR. Nous avons mis en évidence la contribution du gène *MTNR1B* (codant le récepteur 2 de la mélatonine) dans la sécrétion d'insuline et la régulation de l'homéostasie glycémique. La mélatonine est l'hormone clef des rythmes circadiens de l'organisme, et il a été rapporté dans plusieurs études que la perturbation de ces rythmes est nuisible à l'homéostasie glycémique. Nous avons pu ensuite préciser quelles étaient les séquences d'ADN ayant un effet dans ce contrôle glycémique. Nous avons ainsi mis en évidence des mutations non-synonymes rares qui annihilent la voie de signalisation de la mélatonine et qui seraient associées à un risque élevé de DT2. Par ailleurs, via le consortium international MAGIC, nous avons contribué à l'identification de 16 marqueurs génétiques de la glycémie à jeun, de cinq marqueurs de la glycémie après charge de glucose, et de 10 loci intervenant dans la variance de l'hémoglobine glyquée (HbA1c, qui est un marqueur communément utilisé pour évaluer le contrôle glycémique d'un diabète traité). Ce faisant, nous avons montré que si le gène *HK1* codant l'hexokinase 1 est le facteur génétique ayant le plus d'effet sur les valeurs d'HbA1c, il n'intervient pas sur les mécanismes physiologiques de la régulation de la glycémie. C'est uniquement de par les effets des variants d'*HK1* sur la fonction des globules rouges (et sur le risque d'anémie) que ce gène modifie indirectement l'HbA1c. Ce travail montre qu'association ne signifie pas nécessairement causalité et qu'il faut toujours raisonner de façon physiologique dans l'interprétation des données issues des GWAS. D'ailleurs, les derniers résultats du consortium MAGIC montre que plus de 50% des gènes associés à la variance de l'HbA1c sont bel et bien liés aux paramètres sanguins.

En conclusion, pendant mon travail de thèse j'ai contribué à dresser la carte génétique des variants fréquents de l'ADN intervenant sur les traits quantitatifs métaboliques qui définissent le DT2. J'ai montré qu'à certains de ces loci des variants rares à effet(s) biologique(s) fort(s) contribuent aussi au risque de DT2. Les études d'association pangénomique de traits biologiques quantitatifs au-delà de leur intérêt sur le risque de DT2, permettent de progresser dans la compréhension des mécanismes physiologiques de l'homéostasie glycémique et des perturbations primaires qui conduisent au DT2.

Abstract

Type 2 Diabetes is a major health care problem responsible for early morbidities and mortality. T2D prevalence inexorably increases due to dramatic changes in our way of life. T2D is preventable but no generally curable and present medications fail to prevent the worsening of glucose control and the development of complications.

T2D is a systemic disease characterized by both insulin secretion defects and by insulin resistance at the levels of several tissues. Despite more than 40 years of research the aetiologies of T2D are still elusive. T2D is a multifactorial disease with a significant genetic component. However, T2D is a polygenic disorder with the effects of multiple DNA variants having a modest effect and a weak penetrance interaction with environmental factors.

The identification of T2D susceptibility genes has been transformed by *Genome Wide Association Studies* (GWAS) which allow the analysis of hundred of thousands *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) in thousands of samples. Case/control GWAS have identified about 30 loci/genes, so far. However, these loci only explain a small part of T2D inheritance. T2D is defined by the measurement of the continuous trait “glycemia”. A fasting plasma glucose (FPG) higher than 7mM is considered to be abnormal. FPG is highly genetically determined and we have reanalyzed our GWAS data obtained in non diabetic general populations to identify genes that control (normal) glucose values. We first found that SNPs at *MTNR1B* (encoding the melatonin 2 receptor) locus regulate both FPG and insulin secretion. Melatonin is the hormone of darkness that plays a major role in circadian rhythms. The alteration of these physiological rhythms has been shown to impair glucose homeostasis. Subsequently we have screened and functionally analysed the coding part of *MTNR1B* in thousands of T2D cases and controls for rare lack of function mutations that would be associated with a strong risk for T2D. In addition via our contribution to the international consortium MAGIC we have identified 16 genetic markers modulating FPG, five controlling blood glucose after oral glucose load, and ten involved in the variance of glycated haemoglobin (HbA1c, a clinical marker of glucose control in treated diabetic patients). In this respect, we have demonstrated that if *HK1* (encoding Hexokinase 1) is the most potent gene controlling HbA1c, it was not at all involved in the physiology of glucose homeostasis. Instead, variant at *HK1* locus act on red cell function, increase risk for anemia, and only indirectly perturb HbA1c measurement. This study shows that GWAS findings don't mean causality and it is always mandatory to question the physiological validity of any association found through GWAS before implying a gene as causal. In this respect, the MAGIC consortium showed that among all the genes that regulate HbA1c, a large proportion is indeed directly related to red cell function.

In conclusion, during my PhD, I have contributed to achieve a map of frequent SNPs regulating the major glucose control quantitative traits that define T2D. I also showed that rare DNA variants with a stronger biological impact also contribute to T2D risk. Although still of limited value for the prediction of T2D, GWAS have proven extremely useful to make progress in T2D physiology.

Sommaire

LISTE DES ABRÉVIATIONS	- 6 -
INTRODUCTION.....	- 7 -
I. ETAT DES LIEUX DU DIABÈTE DE TYPE 2	- 8 -
1/ Epidémiologie du diabète en France et de part le monde	- 8 -
2/ Diagnostic du diabète.....	- 10 -
3/ Le diabète de type 2 et ses formes poly- et monogéniques.....	- 11 -
4/ Part héréditaire du diabète de type 2 commun	- 13 -
II. HOMÉOSTASIE GLUCIDIQUE ET DIABÈTE DE TYPE 2.....	- 15 -
1/ Fonction des îlots de Langerhans et sécrétion insulinaire : d'une physiologie normale au diabète de type 2.....	- 15 -
2/ D'une action normale de l'insuline à une insulino-résistance observée lors d'un diabète de type 2.....	- 32 -
III. ETIOLOGIES GÉNÉTIQUES DES FORMES MONO- ET POLYGÉNIQUES DU DIABÈTE DE TYPE 2 ET STRATÉGIES EMPLOYÉES POUR LES IDENTIFIER	- 43 -
1/ Approche gène candidat.....	- 43 -
2/ Recherche de gènes soumis à l'empreinte parentale.....	- 46 -
3/ Etude de liaison génétique au sein de familles.....	- 46 -
4/ Etude d'association pangénomique cas/contrôles dans le diabète de type 2	- 49 -
5/ Le 'dark matter'.....	- 52 -
6/ Etudes d'association pangénomique des traits quantitatifs associés au diabète de type 2 commun.....	- 53 -
BUT DE LA THÈSE	- 56 -
PRÉSENTATION DES TRAVAUX.....	- 57 -
I. GÉNÉTIQUE DE LA GLYCÉMIE À JEUN ET DES RÉPONSES GLYCÉMIQUE ET INSULINÉMIQUE À L'HYPERGLYCÉMIE PROVOQUÉE	- 61 -
II. GÉNÉTIQUE DE L'HÉMOGLOBINE GLYQUÉE.....	- 77 -
III. ÉTUDES FONCTIONNELLES DE VARIANTS GÉNÉTIQUES ASSOCIÉS À LA GLYCÉMIE	- 84 -
DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	- 93 -
Annexe 1.....	- 101 -
Annexe 2.....	- 102 -
Annexe 3.....	- 103 -
FIGURES	- 104 -
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	- 136 -

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADA	American Diabetes Association
AGNE	Acide gras non estérifié
Canaux K ⁺ -ATP	Canaux potassium sensibles à l'ATP
DN	Diabète néonatal
DT1	Diabète de type 1
DT2	Diabète de type 2
GABA	Acide gamma-amino-butyrique
GCK	Glucokinase
GLP1	Glucagon-like peptide 1
GLUT	Transporteur de glucose
GWAS	Genome-wide association study
Glycémie-2h	Glycémie mesurée 2 heures après une HGPO
HbA1c	Hémoglobine glyquée
HGPIV	Hyperglycémie provoquée par voie intraveineuse
HGPO	Hyperglycémie provoquée par voie orale
HK1	Hexokinase 1
HOMA-B	Indice d'évaluation de la fonction de la cellule beta à jeun
HOMA-IR	Indice d'évaluation de l'insulino-résistance à jeun
IAPP	Polypeptide amyloïde
INS	Insuline
Insulinémie-2h	Insulinémie mesurée 2 heures après une HGPO
KLF	Krüppel-like factor
LD	Déséquilibre de liaison
LH	Hypothalamus latéral
IMC	Indice de masse corporelle
MAF	Fréquence de l'allèle mineur
MODY	Maturity-onset diabetes of the young
MTNR1B/MT2	Récepteur 2 de la mélatonine
OMS	Organisation mondiale de la santé
OR	Odds ratio
SEE	Séquençage de l'exome entier
SNP	Single nucleotide polymorphism
VLDL	Very low density lipoprotein
VMH	Hypothalamus ventromédian

INTRODUCTION

I. ETAT DES LIEUX DU DIABÈTE DE TYPE 2

1/ Epidémiologie du diabète en France et de part le monde

Le diabète est une maladie chronique déjà décrite (en tant que polyurie, étant l'un des signes principaux du diabète sucré) dans le papyrus Ebers qui constitue l'un des plus anciens traités médicaux nous étant parvenu à ce jour, rédigé au temps d'Amenhotep I^{er} ou d'Amenhotep III selon les égyptologues (XV^{ème} ou XVI^{ème} siècle avant Jésus-Christ). Le diabète a aujourd'hui atteint des proportions épidémiques malgré le fait que ce ne soit pas une maladie infectieuse : 240 millions d'individus sont atteints de diabète de part le monde et il fait autant de victimes que le sida (3,8 millions de décès estimés dans le monde en 2007) (1). En 50 ans, l'épidémie s'est développée dans nombre de populations dont la façon de vivre a radicalement changé : d'un modèle traditionnel imprégné d'agriculture à un mode de vie « occidentalisé ». Aujourd'hui, dans la plupart des pays industrialisés, la prévalence du diabète dans la population adulte (entre 20 et 79 ans) a atteint environ 6% (1-3). D'ici à 2025, il est estimé que 380 millions de personnes soient diabétiques (dont 80% habitant dans les pays en voie de développement), soit plus de 7% de la population adulte mondiale (1-3). En 2007, la région du Pacifique Occidental et l'Europe affichaient les effectifs les plus élevés de personnes diabétiques. En termes de prévalence, les chiffres les plus inquiétants venaient de la Méditerranée Orientale (9,2%), du Moyen-Orient (9,2%) et de l'Amérique du Nord (8,4%). D'ici à 2025, il est estimé que les prévalences du diabète en Amérique centrale et en Amérique du Sud se rapprocheront dangereusement de celle d'Amérique du Nord (estimées à 9,3% et 9,7%, respectivement). La région du Pacifique Occidental afficherait l'effectif le plus élevé de sujets atteints estimé à 100 millions (**Figure 1**) (1).

En France métropolitaine, la prévalence du diabète traité (personnes auxquelles ont été délivrés au moins trois fois dans l'année, à trois dates différentes, un antidiabétique oral et/ou de l'insuline) a augmenté de 2,6 à 3,6% entre 2000 et 2005, soit une augmentation annuelle de 5,7% (4). En 2007, la prévalence du diabète traité en France (incluant les régions d'outre-mer) était de 3,95%, soit 2,5 millions de personnes atteintes. Il existait un risque accru chez les hommes ayant un âge supérieur à 40 ans : près d'un homme sur cinq était diabétique à 75 ans (**Figure 2**). Les prévalences les plus fortes étaient constatées dans les régions d'outre-mer : la Réunion (7,8%), la Guadeloupe (7,3%) et la Martinique (6,8%). A l'inverse de la métropole,

il existait un risque accru chez les femmes avec en moyenne un écart de prévalence de deux points avec les hommes. En métropole, les régions du Nord et du Nord-Est montraient les plus fortes prévalences : du Nord-Pas-de-Calais à l'Alsace, une large bande limitrophe présentait des prévalences du diabète nettement supérieures à la moyenne nationale ($> 4,5\%$) (4). A l'inverse, les prévalences dans le Grand-Ouest de la métropole étaient un à deux points inférieurs à la moyenne nationale (**Figure 3**) (4). Globalement, l'épidémie de diabète n'a cessé de progresser en France. Il est important de noter toutefois que la situation française aujourd'hui est identique à celle des Etats-Unis ou de la Grande-Bretagne il y a une dizaine d'années : la prévalence de 3,9% observée aux Etats-Unis en 1998 est semblable à la prévalence française de 2007. En 2016, il est estimé en France que 2,8 millions d'individus soient diabétiques, soit une prévalence d'environ 4,5%, avec des disparités géographiques davantage accrues (4).

Même s'il faut tenir compte dans cette progression de l'augmentation de l'espérance de vie des malades et d'un meilleur dépistage, le diabète reste un problème de santé publique majeur : en 2000, le coût global des soins donnés aux patients diabétiques en France était estimé à 5,71 milliard d'euros (2,4 milliards d'euros en soins hospitaliers ; 3,3 milliards d'euros en soins de ville), soit environ 5% des dépenses de l'assurance maladie, avec une progression annuelle estimée à 8,7% (5). Au niveau mondial, on s'attend à ce que les dépenses en soins de santé pour le diabète s'élèvent à plus de 11% des dépenses totales de santé en 2010 (équivalentes à 376 milliards de dollars). D'ici 2030, ce chiffre devrait excéder les 490 milliards de dollars (1).

En outre, le diabète altère fortement la qualité de vie du malade par le biais de ses complications micro- et macrovasculaires (**Figure 4**) qui diminuent l'espérance de vie de 25% en moyenne chez des patients atteints à un âge moyen de 40-50 ans (6). Dans les pays industrialisés, le diabète est l'une des cinq premières causes de mortalité et de handicap (via la cécité, les insuffisances rénales et/ou les amputations que le diabète peut engendrer) (1). Le 20 décembre 2006, l'Assemblée générale des Nations Unies votait la Résolution 61/225, reconnaissant le diabète en tant que « maladie chronique, invalidante et coûteuse, associée à de lourdes complications qui représentent des risques graves pour les familles, les pays et le monde entier ». Elle a fait du 14 novembre, date de l'actuelle Journée Mondiale du Diabète, une journée des Nations Unies, qui est célébrée chaque année depuis 2007.

2/ Diagnostic du diabète

Les critères de diagnostic du diabète ont deux buts principaux :

- i/ identifier et classer des individus atteints de diabète et donc proposer un traitement approprié ;
- ii/ fournir un outil dédié aux études épidémiologiques visant à déterminer la prévalence et l'incidence du diabète et de ses facteurs de risque, dans le cadre de plans de santé ou de recherche.

Le diabète est défini par l'Association Américaine du Diabète (ADA pour *American Diabetes Association*) comme étant « un groupe de maladies métaboliques caractérisé par une hyperglycémie résultant de dysfonctionnements de la sécrétion d'insuline par les cellules beta pancréatiques, dans l'action de l'insuline ou des deux. L'hyperglycémie chronique s'associe à long terme à des dommages touchant divers organes incluant plus particulièrement les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux sanguins » (7). Le diagnostic du diabète est basé sur les dernières recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS ou WHO pour *World Health Organization*) datées de 1999 mais aussi sur celles de l'ADA datées de 1997. La substantifique moelle de ces deux définitions se vaut et se trouve résumée dans la **Table 1**. Brièvement, quand le patient montre des symptômes classiques du diabète (polyurie, polydipsie, perte de poids inexplicée, irritabilité, extrême fatigue, infections fréquentes), un diabète peut être diagnostiqué quand la glycémie à jeun du patient est supérieure ou égale à 7mmol/l ou quand sa glycémie deux heures après une hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO, ingestion de 75g de glucose à jeun) est supérieure ou égale à 11,1mmol/l (7). Par contre, quand le patient est asymptomatique, le diagnostic ne peut être révélé sur une seule valeur de glycémie. Une glycémie anormale doit être confirmée à une date postérieure. Il est recommandé aux patients montrant une hyperglycémie à jeun de passer un test HGPO afin de confirmer ou d'exclure tout diabète (7).

Les recommandations de l'ADA et de l'OMS sont mises à jour chaque année. En 2009, l'ADA a décidé de promouvoir la mesure de l'hémoglobine glyquée (HbA1c) comme un nouveau test de diagnostic du diabète (8). D'après le président élu de l'ADA Richard M. Bergenstal : « Nous pensons que l'utilisation de l'HbA1c encouragera un plus grand nombre de personnes à tester leur diabète car cette mesure ne requiert pas d'être à jeun, et aidera à réduire davantage le nombre de sujets non diagnostiqués mais vivants avec cette pathologie chronique et potentiellement mortelle. En outre, une détection précoce peut faire une énorme différence dans la qualité de vie du patient ». Une HbA1c comprise entre 5,7 et 6,4%

révélerait que le patient est dans un état prédiabétique (indiquant une HbA1c plus élevée que la normale mais pas assez pour diagnostiquer un diabète). Un diabète serait diagnostiqué pour une valeur d'HbA1c supérieure ou égale à 6,5%. Cette décision a été (et continue d'être) pour le moins controversée. J'aborderai plus profondément ce point au cours de la présentation de mes travaux de thèse.

3/ Le diabète de type 2 et ses formes poly- et monogéniques

Il existe deux formes principales de diabète :

i/ Le diabète de type 1 (DT1) qui est une endocrinopathie auto-immune détruisant les cellules beta pancréatiques et entraînant une incapacité totale de l'organisme à produire de l'insuline. Le DT1, qui touche entre 5 et 10% des individus diabétiques (9), ne sera pas abordé dans ce manuscrit.

ii/ Le diabète de type 2 (DT2) qui ne résulte pas d'un défaut d'immunité de l'organisme et qui touche entre 85 et 95% des individus atteints de diabète.

N.B : J'ai simplifié la description du DT1 en diabète de type 1a. Il existe en effet un diabète de type 1b dans lequel aucun signe sérologique d'auto-immunité n'est révélé (9; 10). Ainsi, ce type 1b peut être fortement assimilé à des formes sévères de DT2 (insulinothérapie dès la déclaration du diabète avec possible acidocétose). En pratique donc, il peut être inclus dans le DT2.

Le DT2 commun est une pathologie complexe car multifactorielle (2; 11). On parle aussi de maladie polygénique : la survenue d'un DT2 commun (autour de l'âge de 65 ans en moyenne en France (4)) dépend d'une forte composante environnementale (incarnée par une inactivité physique, une nourriture riche en graisse, le vieillissement, des événements durant la vie fœtale et à la naissance...) interagissant avec un large spectre de variants génétiques situés dans des loci de susceptibilité au DT2 incluant ou non des gènes. Les contributions relatives des variants génétiques et de l'environnement diffèrent considérablement d'un individu à un autre même s'ils ont des phénotypes cliniques très similaires (11). Quoiqu'il en soit, l'obésité reste le facteur de risque principal du DT2. Environ 70% des individus atteints de DT2 sont manifestement obèses au moment du diagnostic, avec le plus souvent une accumulation de graisse au sein et autour de la cavité abdominale (11). Mais il est important de noter que plus de 50% des personnes obèses ne sont pas atteintes de diabète et qu'un nombre non négligeable de personnes atteintes de DT2 a un indice de masse corporelle (IMC) tout à fait normal. Ainsi un DT2 ne peut être seulement expliqué par l'obésité.

Parmi les individus atteints de DT2, moins de 10% présentent une forme monogénique, c'est-à-dire associée au dysfonctionnement d'un gène particulier (11). D'un point de vue clinique, les patients atteints d'une forme monogénique de DT2 montrent divers degrés de sévérité d'hyperglycémie chronique associée principalement à des anomalies de la sécrétion insulinaire, au niveau des cellules beta pancréatiques. Plusieurs sous-types de DT2 monogénique ont été caractérisés suivant l'âge d'apparition de la maladie et les phénotypes cliniques associés :

i/ Le diabète de type MODY (*Maturity-Onset Diabetes of the Young*) qui est une forme de DT2 familiale à transmission autosomale dominante et à survenue précoce (classiquement avant l'âge de 25-30 ans). La prévalence du MODY est estimée entre 2 et 5% des DT2 (12; 13). Le MODY n'est pas une simple entité mais représente une pathologie hétérogène au regard d'un large spectre de caractéristiques génétiques, métaboliques et cliniques (13). Au moins sept sous-types de MODY liés à des mutations dans sept gènes de susceptibilité ont été décrits dans la littérature. Les protéines codées par ces sept gènes ont toutes un rôle crucial dans le développement et la fonction des cellules beta pancréatiques.

ii/ Le diabète néonatal ou le diabète de la jeune enfance (DN) qui comme son nom l'indique, survient dans les premiers mois de vie. Le DN est une maladie métabolique très rare (~1/300 000 naissances) mais potentiellement dévastatrice entraînant chez les patients atteints des niveaux plasmatiques d'insuline très bas voire indétectables (14). Environ la moitié des cas de DN ont une forme transitoire mais peuvent finalement rechuter durant la puberté ou un peu plus tard dans la vie. A l'opposé, les patients ayant une forme permanente de DN requièrent un traitement continu dès la survenue de leur hyperglycémie (14).

iii/ Les syndromes monogéniques associés à un diabète précoce, comme les syndromes de Wolcott-Rallison ou de Wolfram, qui touchent différents organes à la fois (incluant les îlots de Langerhans qui comprennent les cellules beta pancréatiques). Ces syndromes montrent principalement une transmission récessive et sont, dans ce cas, souvent liés à une consanguinité familiale (15).

Je reviendrai sur l'étiologie génétique des formes poly- et monogéniques du DT2 et les phénotypes associés dans la partie III de cette introduction.

4/ Part héréditaire du diabète de type 2 commun

Plusieurs indices montrent une contribution génétique dans la survenue d'un DT2 commun :

i/ Le DT2 commun montre clairement des agrégations familiales, qui toutefois ne suivent pas une transmission Mendélienne classique. Une histoire familiale de DT2 augmente de 2 à 4 fois le risque de devenir diabétique de type 2 (2). Environ 25% des apparentés au premier degré de patients atteints de DT2 développent une intolérance au glucose ou un DT2 au cours de leur vie. Si les deux parents sont atteints, la prévalence de DT2 chez les enfants approche les 60% à l'âge de 60 ans (2), alors qu'elle est au moins 10 fois inférieure dans la population générale (cf supra ; partie I.1/ de cette introduction).

ii/ Le DT2 commun montre de très hautes prévalences dans certains groupes ethniques isolés (*i.e.* habitant dans un même environnement). Chez les Indiens Pima habitant dans le désert d'Arizona aux Etats-Unis, la prévalence de DT2 commun est estimée à 40-50% dès l'âge de 35 ans et atteint 70% entre 55 et 64 ans (16). Les populations Mexico-Américaine et Portoricaine vivant aux Etats-Unis montrent aussi des prévalences de DT2 extrêmes (24% et 26%, respectivement chez des personnes âgées de 45 à 74 ans) (17). La petite île de Nauru située dans le Pacifique et comptant une communauté d'environ 14 000 habitants, constitue le pays montrant la plus haute prévalence de DT2 estimée à 30,9% en 2010 (1).

iii/ Le DT2 montre un très grand taux de concordance entre jumeaux monozygotes comparé aux jumeaux dizygotes. Comme les jumeaux dizygotes partagent l'environnement (à la fois intra- et extra-utérin) mais seulement 50% de leurs variants génétiques, les taux de concordance entre jumeaux monozygotes en plus de ceux entre jumeaux dizygotes sont utilisés afin de distinguer les contributions génétiques des apports environnementaux dans la survenue d'un DT2 et *in fine* d'évaluer l'héritabilité du DT2 (2). Chez les sujets âgés de plus de 60 ans, les taux de concordance dans la survenue d'un DT2 sont estimés à 35-90% chez les jumeaux monozygotes, comparés à 17-37% chez les jumeaux dizygotes (2; 18-20). Notons qu'il existe dans la littérature une forte variabilité des taux de concordance selon les études. Sont probablement en cause les critères utilisés pour la définition du diabète (basée sur la glycémie à jeun, ou le test HGPO, ou encore les traitements anti-diabétiques), l'utilisation ou non d'auto-questionnaire sans analyses sanguines, l'inclusion ou non de cas extrêmes, qui constituent un ensemble d'éléments pouvant facilement modifier les résultats (18). Via un design visant à éviter ces biais, Poulsen et al. ont estimé l'héritabilité du DT2 à 26% en incluant dans leur modèle statistique la variance environnementale, la variance génétique et la

variance environnementale partagée par les jumeaux (18). En suivant le même modèle, l'héritabilité du DT2 ou de l'intolérance au glucose s'élevait à 61% (18).

Il est à noter que les taux de concordance chez les jumeaux monozygotes peuvent sous-estimer les effets génétiques car la nutrition intra-utérine chez des jumeaux partageant le même placenta (jumeaux 'monochorioniques') peut entraîner un retard de croissance comparé au jumeaux dizygotes (2). Or un faible poids de naissance est lui-même associé à une augmentation du risque de DT2 plus tard dans la vie (2). En outre, une obésité ne peut être « casée » dans une composante environnementale, étant elle-même une pathologie très héritable (18; 21). Par conséquent, une répartition précise de tous les protagonistes dans la survenue d'un DT2 commun (gènes, obésité, poids de naissance, malnutrition, vieillesse...) reste difficilement quantifiable car ces facteurs de risque ont tendance à se recouper. Quoiqu'il en soit, la part génétique dans la survenue d'un DT2 est aujourd'hui évidente.

Ce constat s'oppose fortement aux pensées médicales répandues il y a encore moins de 20 ans, qui accusaient les patients atteints de diabète « gras », alias de DT2, de mériter leur pathologie dû à leur mauvais mode de vie. Cela n'a fait qu'aggraver l'isolement des malades. Cette mauvaise perception du DT2 est encore visible aujourd'hui.

II. HOMÉOSTASIE GLUCIDIQUE ET DIABÈTE DE TYPE 2

L'homéostasie est un terme qui a été initialement élaboré et défini par Claude Bernard en 1850 comme étant la capacité que peut avoir un système ouvert ou fermé à conserver son équilibre de fonctionnement en dépit des contraintes qui lui sont extérieures. Le glucose est un aldohexose directement assimilable par l'organisme. Il est globalement reconnu comme une essence vitale au bon fonctionnement de l'organisme mais devenant rapidement toxique à forte dose via divers mécanismes (comme la glycation des protéines qui inhibe leurs fonctions). Par conséquent, l'homéostasie glucidique est cruciale et implique des interactions complexes entre des mécanismes humoraux et nerveux qui fonctionnent de concert afin de réguler finement la balance entre production et utilisation du glucose. Un patient atteint de DT2 montre des dysfonctionnements dans cette balance incarnés par une glycémie à jeun anormalement élevée et liés à des défauts de sécrétion et d'action d'une hormone clef dans la régulation de la glycémie : l'insuline.

NB : La majeure partie des protéines codées par les gènes de susceptibilité au DT2 élucidés à ce jour ont un rôle majeur dans les cellules beta pancréatiques et leur fonction de sécrétion insulinaire (cf infra ; partie III. de cette introduction). Ainsi, je me suis avant tout focalisée sur les cellules beta et leur rôle crucial dans l'homéostasie glucidique. Le cerveau et les organes cibles de l'insuline comme le foie, les muscles squelettiques ou encore le tissu adipeux seront beaucoup moins abordés.

1/ Fonction des îlots de Langerhans et sécrétion insulinaire : d'une physiologie normale au diabète de type 2

NB : Tout au long de cette sous-partie, la physiologie normale sera écrite en noir alors que les événements et mécanismes décrits dans le DT2 seront écrits en violet.

a) Structure et fonction des îlots de Langerhans

Le pancréas est un organe complexe constitué d'un tissu endocrine (~2%) et majoritairement d'un tissu exocrine (~98%) produisant les enzymes nécessaires à la digestion et composé essentiellement de structures lobulaires appelées 'acini' mais aussi de structures ramifiées constituant les canaux pancréatiques (**Figure 5**) (22). C'est un étudiant allemand en anatomie, Paul Langerhans, qui a été le premier à décrire en 1869 des « îlots de cellules

distinctes » distribués tout au long du pancréas. Les ‘îlots de Langerhans’, ainsi nommés aujourd’hui, incarnent la partie endocrine du pancréas. Les îlots ont une forme quasi-sphérique, avec un diamètre moyen compris entre 40 et 400µm (22). Un pancréas humain sain peut contenir jusqu’à un million d’îlots ayant chacun sa propre anatomie complexe, sa vascularisation et son innervation (cf **Figure 5**). La masse totale des îlots représente seulement un gramme de tissu environ (22). Un îlot comprend de quelques à 5 000 cellules endocrines appartenant principalement à cinq sous-types :

- i/** les cellules beta (~60% des cellules endocrines d’un îlot humain adulte) qui sécrètent l’insuline (seule hormone hypoglycémisante de l’organisme), l’acide gamma-amino-butérique (GABA) et les polypeptides amyloïdes (IAPP ou amyline) ;
- ii/** les cellules alpha (20-30%) qui sécrètent le glucagon (hormone hyperglycémisante) ;
- iii/** les cellules delta (~10%) qui sécrètent la somatostatine ;
- iv/** les cellules PP (<5%) qui sécrètent le polypeptide pancréatique ;
- v/** les cellules epsilon (~1%) qui sécrètent la ghréline.

Les îlots de Langerhans sont très vascularisés et reçoivent environ 15% des ressources sanguines du pancréas (soit 5 à 10 fois plus de sang par volume de tissu que tout le compartiment exocrine). Les îlots reçoivent le sang artériel via une ou plusieurs artérioles qui se ramifient en un réseau de capillaires denses dans le corps de l’îlot. Le large réseau de capillaires permet aux îlots de capter rapidement les nutriments et de relarguer en retour leurs sécrétions hormonales. Les sécrétions endocrines sont d’abord déversées dans l’espace extracellulaire des îlots avant d’être drainées par le sang vers la veine porte (23; 24).

Par ailleurs, les îlots de Langerhans sont très richement innervés, principalement par des fibres d’origine sympathique (nerf splanchnique) et parasympathique (nerf vague) dont les centres nerveux de contrôle sont respectivement localisés dans l’hypothalamus ventromédian (VMH) et latéral (LH). Les fibres sympathiques et parasympathiques innervant les îlots impliquent respectivement les neurotransmetteurs norépinephrine et acétylcholine, accompagnés d’un large spectre de neuropeptides biologiquement actifs (**Figure 6**) (23-25).

L’arrangement anatomique des îlots varie selon les espèces. Chez les rongeurs, la majorité des cellules beta forme un corps central entouré d’un fin manteau de cellules alpha et delta. Chez l’homme (et les vertébrés les plus évolués), l’organisation entre les populations de cellules beta, alpha et delta est moins bien définie (**Figure 7**) (23; 26). Quoiqu’il en soit, l’organisation anatomique au sein même d’un îlot a une influence profonde dans la capacité des cellules beta à reconnaître et répondre aux signaux physiologiques. Les cellules endocrines composant l’îlot sont séparées du tissu exocrine par une capsule de collagène qui

entoure l'îlot (22). Il existe un grand nombre de mécanismes permettant à toutes les cellules d'un îlot de communiquer : elles fonctionnent comme un micro-organe très élaboré où chacun des types cellulaires participe au fonctionnement de l'ensemble. Par exemple, les cellules sont fonctionnellement couplées par un réseau de jonctions lacunaires (ou *jonction gap* inspirée de l'anglais) qui permet de faire transiter des petites molécules telles que les ions (les ions Ca^{2+} notamment) ou l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) (22). Il a par exemple été montré dans les cellules beta l'importance de ces jonctions, couplées à la connexine 36, dans la régulation de la réponse insulino-sécrétoire (27; 28). Les cellules peuvent aussi communiquer par un contact cellule-cellule via des molécules d'adhésion à la surface des cellules. Il a par exemple été montré l'importance de ces interactions impliquant l'E-cadhérine ou les éphrines dans la régulation de la fonction des cellules beta (29; 30). Un autre type de communication au sein d'un îlot peut être exercé via les effets paracrines et autocrines des cellules de l'îlot : une substance biologiquement active sécrétée par une cellule peut influencer l'état fonctionnel de la cellule voisine (paracrinie) ou d'elle-même (autocrinie) (23). Le large spectre des interactions possibles intra-îlots reflète le besoin d'un réglage de communication fin entre les réponses sécrétoires synchronisées de plusieurs cellules de l'îlot, afin de relarguer un ensemble précis d'hormones approprié au statut physiologique dominant de l'organisme.

→ 90% des patients atteints de DT2 montrent un dépôt amyloïde des îlots (**Figure 8**). Les patients qui ont des défaillances sécrétoires les plus prononcées auraient tendance à montrer les dépôts les plus importants (31). Le dépôt amyloïde est composé de fibrilles non solubles formées de polypeptides IAPP qui ont oligomérisé. Les IAPP sont sécrétés en même temps que l'insuline par les cellules beta suivant un ratio de 1:10-50 (32). Les IAPP n'ont pas de fonctions physiologiques connues chez l'homme. Les mécanismes sous-jacents expliquant leur oligomérisation et la formation consécutive des dépôts amyloïdes n'ont toujours pas été élucidés à ce jour. Et l'on ne sait pas si cette observation reflète simplement la détérioration et la destruction des îlots. Il est à noter que des dépôts similaires ont été retrouvés chez certaines personnes âgées non-diabétiques (33; 34). Cependant, certaines études récentes ont montré que la formation de petits oligomères de IAPP intracellulaires pourrait être cytotoxique via une augmentation de l'apoptose des cellules beta (34).

D'autres changements histologiques des îlots observés chez les patients atteints de DT2 incluent une diminution de leur masse totale, une altération des proportions relatives de chaque population de cellules endocrines, et des degrés variables de fibrose (33).

b) Synthèse et sécrétion insulinique par les cellules beta pancréatiques

Au vu de la nécessité d'une sécrétion rapide d'insuline en réponse à la demande métabolique, couplée à un processus généralement lent de synthèse d'hormones polypeptidiques, la cellule beta est hautement spécialisée dans la production et le stockage de l'insuline représentant au final ~10% de la masse totale des protéines de la cellule. Un équilibre dynamique régit la masse des cellules beta, résultant de quatre processus fondamentaux lors du développement du pancréas endocrine mais aussi chez l'adulte, car ils conditionnent les propriétés de plasticité du pancréas endocrine :

i/ La réplication des cellules beta endocrines préexistantes (hyperplasie). Au cours du développement, les cellules beta une fois différenciées prolifèrent au sein des îlots. Ce processus, qui est quantitativement très important chez le fœtus et le nouveau-né (10%), diminue avec l'âge (3% chez l'adulte) mais n'est pas nul (22) (p46 traité diabéto). En outre, le glucose et d'autres nutriments, des hormones (comme l'hormone de croissance [GH], la PTHLH [*parathyroid hormone-like hormone*], le GLP1 [*glucagon-like peptide 1*]) et des facteurs de croissance (comme TGF- β [*transforming growth factor*], EGF [*epidermal growth factor*]) peuvent entraîner une prolifération des cellules beta (22).

ii/ La différenciation de cellules précurseurs en cellules beta (néogenèse). La nature exacte de ces précurseurs reste incertaine à ce jour (cellules progénétrices canalaire ? transdifférenciation ? cellules précurseurs intra-îlots ?) (22).

iii/ La mort cellulaire programmée (apoptose). Au cours du développement, l'apoptose participe au contrôle de l'organogenèse. Pendant la vie fœtale, l'apoptose est quasi-inexistante dû à la surexpression de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-x1 (22). A la naissance et pendant la vie postnatale, le processus d'apoptose n'est plus inhibé dans le pancréas. Cependant le glucose interviendrait dans le contrôle de l'apoptose en permettant la survie des cellules beta par inhibition de leur programme « suicide » (35).

iv/ La variabilité de la taille des cellules beta (hypertrophie).

Revenons à la fonction maîtresse des cellules beta : la sécrétion d'insuline. Chez l'homme, le gène codant la préproinsuline (*INS*), c'est-à-dire le précurseur de l'insuline, est localisé dans le chromosome 11p15.5. *INS* contient trois exons codant le peptide signal dans la partie N-terminale de la préproinsuline, la chaîne B, le peptide C et la chaîne A (**Figure 9**). La transcription et l'épissage alternatif produisent un ARN messager de 600 nucléotides dont la translation donne la préproinsuline, un polypeptide de 11,5kDa. Toutes les étapes de la

biosynthèse, du traitement et du stockage de l'insuline se trouvent résumées dans la **Table 2**, avec les temps estimés de chaque étape (23; 25). La préproinsuline est rapidement relâchée dans les citernes du réticulum endoplasmique, où des enzymes protéolytiques coupent le peptide signal, générant ainsi la proinsuline (9kDa). Les conformations de la proinsuline et de l'insuline sont très similaires, et une des fonctions du peptide C est d'aligner les ponts disulfures qui lient les chaînes A et B de telle sorte que la molécule soit correctement repliée lors du clivage. La proinsuline est ainsi transportée dans les microvésicules de l'appareil de Golgi, où elle est enveloppée dans des vésicules membranaires, plus connues sous le nom de 'granules de sécrétion'. La conversion de proinsuline en insuline est initiée dans le Golgi et continue dans les granules par l'action de deux endopeptidases (prohormones convertases 2 et 3) et de la carboxypeptidase H, qui détachent le peptide C des deux autres chaînes A et B qui forment au final l'insuline (**Figure 10**) (23; 25). La forme active de l'insuline se présente sous forme monomérique composée d'une structure globulaire dont le centre est constitué d'un noyau hydrophobe qui peut se dimériser spontanément. Trois dimères de noyau peuvent s'associer en hexamères, ce qui requiert la présence de deux atomes Zn jouant un rôle de coordination entre les deux monomères (25). Ces hexamères d'insuline forment des cristaux qui représentent la forme de stockage majeure de l'hormone dans les granules de sécrétion (cf **Table 2**). Au final, ces granules sont constitués en grande partie d'insuline et de peptide C (~80% des protéines au sein des granules), mais aussi de nombreux autres composants incluant des peptidases, des hormones peptidiques et un large spectre de peptides biologiquement actifs ayant des fonctions incertaines.

Les cellules beta répondent à une augmentation de la glycémie par une augmentation de la production d'insuline mais aussi de la sécrétion insulinaire maintenant ainsi un stockage constant d'insuline. Il existe une relation sigmoïdale entre la glycémie et la biosynthèse insulinaire (**Figure 11**), avec un seuil de glycémie compris entre 2 et 4mmol/l. Le seuil stimulant la sécrétion insulinaire est quant à lui un peu plus élevée (~5mmol/l) (23) ; cela assure ainsi une réserve adéquate d'insuline dans les cellules beta. En outre, le GLP1, la GH, la prolactine et l'hormone placentaire lactogène (HPL) régulent de façon non négligeable la biosynthèse d'insuline via notamment une stimulation de la transcription du gène *INS* (36; 37). Les effets de la leptine et de l'insuline elle-même restent discutés (25).

Une réponse physiologique appropriée en terme d'exocytose des granules de sécrétion nécessite des mécanismes complexes pour déplacer les granules de leur site de stockage dans la cellule jusqu'aux sites d'exocytose au niveau de la surface intérieure de la membrane plasmique. Le rôle des composants du cytosquelette, notamment des microtubules et

microfilaments, dans la translocation intracellulaire des granules de sécrétion est prépondérant (38; 39). Les microtubules sont formés via la polymérisation de sous-unités de tubuline et ils composent un large réseau émanant de la région périnucléaire de la cellule (40). Il existe un renouvellement constant de la tubuline de sorte que le réseau soit constamment réagencé. Ce réseau incarnerait une route pour les granules de sécrétion et des protéines contractiles (comme la kinésine et la dynéine) feraient déplacer ces granules le long du réseau de microtubules. Les microfilaments sont quant à eux formés d'actine. La polymérisation des microfilaments est régulée par des agents pouvant altérer la sécrétion d'insuline, et l'inhibition pharmacologique de la formation des microfilaments empêche la sécrétion d'insuline (41). Les chaînes légères et lourdes de myosine sont fortement exprimées dans la cellule beta, suggérant une interaction possible entre actine et myosine qui propulserait les granules le long du réseau de microfilaments (23).

Durant l'exocytose, la membrane de la granule et la membrane plasmique de la cellule beta fusionnent, déchargeant le contenu des granules dans l'espace interstitiel. La grande majorité des connaissances acquises sur les mécanismes d'exocytose provient des études sur la libération neuronale des neurotransmetteurs dans les espaces synaptiques : ces exocytoses sont très comparables à celles observées dans les cellules beta pancréatiques (23). L'amarrage des granules sur la surface interne de la membrane plasmique se produit via la formation d'un complexe multimérique de protéines connu sous le nom du complexe SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) qui incluent des protéines liées aux granules de sécrétion (v-SNARE pour *vesicle-SNARE*) comme VAMP2 (*synaptobrevin 2*) et des protéines liées à la membrane plasmique (t-SNARE pour *target-SNARE*) comme STX1A (*syntaxin 1A*) et SNAP25 (*synaptosomal-associated protein 25*) (**Figure 12**) (42; 43). Ces protéines interagissent en enroulant leurs domaines superspiralisés pour former un complexe extrêmement stable avant l'exocytose. Les granules amarrées ne fusionnent avec la membrane et ne libèrent leur contenu qu'en présence d'une concentration intracellulaire élevée de calcium qui interagit avec les synaptotagmines, les rebphilines, les protéines MUNC, DOC2 et les protéines activatrices de sécrétion Ca^{2+} dépendantes (CAPS) (43). Les granules de sécrétion sont distribuées dans tout le cytoplasme des cellules beta, et il semble que le transport des granules des sites distants jusqu'à la membrane plasmique soit régulé indépendamment des mécanismes finaux de sécrétion, avec un réservoir de granules stocké près de la surface intérieure de la membrane plasmique. La fusion de cet ensemble de granules « prêtes à l'emploi » pourrait jouer un rôle majeur dans la première phase rapide de sécrétion insulinaire en réponse à une stimulation glucidique (41).

→ De manière générale, il est aujourd'hui reconnu que la masse des cellules beta chez des patients diabétiques de type 2 est réduite de 30 à 60% comparée à des individus normoglycémiques (avec ajustement à l'IMC) (cf **Figure 8**) (33; 44; 45). La masse des cellules beta a aussi été montrée diminuée chez les personnes ayant une hyperglycémie à jeun (45). Cette diminution serait due à une diminution en nombre de cellules et non une réduction du volume de chaque cellule. Il a été montré qu'une augmentation de l'apoptose des cellules beta sans une augmentation compensatoire de néogenèse ou d'hyperplasie serait responsable de ce déclin (45; 46). Le fait que la diminution de la masse des cellules beta soit clairement présente chez des personnes ayant seulement une hyperglycémie à jeun suggère que la perte des cellules beta n'est pas confinée aux stades terminaux de la maladie. Il est cependant important de noter que la réduction de la masse des cellules beta ne peut expliquer à elle-seule la diminution de la capacité des patients atteints de DT2 à sécréter de l'insuline, ce qui suggère des défauts fonctionnels supplémentaires (33).

Par ailleurs, il a été montré que le ratio proinsuline : insuline en circulation est au moins deux fois plus important chez des patients atteints de DT2 que chez des sujets normoglycémiques. Cette augmentation a été rapportée lors d'états de sécrétion insulinaire basale et stimulée. Cette observation sous-entend une conversion de proinsuline en insuline moins fructueuse au sein des granules de sécrétion chez les patients atteints de DT2 (23).

c) Régulation de la sécrétion insulinaire

Dans les cellules beta, les contrôles de la biosynthèse et de la sécrétion d'insuline sont majoritairement indépendants, permettant une grande capacité de stockage de ces cellules. A l'exception remarquable de substrats énergétiques comme le glucose, ou de certaines hormones comme le GLP1, les stimuli de la sécrétion d'insuline ont rarement une influence majeure sur la biosynthèse de l'hormone (23).

Afin d'assurer un niveau d'insuline circulante approprié par rapport au statut métabolique dominant de l'organisme, les cellules beta ont la capacité de détecter finement la concentration sanguine des nutriments et des hormones mais aussi l'activité du système nerveux autonome. Chez l'homme, le déclencheur (ou stimulus primaire) physiologique majeur de la sécrétion d'insuline est la concentration sanguine de glucose mais aussi d'autres nutriments (leucine, mannose, glycéraldéhydes) et des sulphonylurées (25). En réalité, le seul vrai stimulus primaire reste le glucose car son effet s'exerce dans une gamme de

concentrations physiologiques, alors que les autres déclencheurs potentiels ont pour la plupart été étudiés *in vitro* dans des gammes de concentrations largement supraphysiologiques (25). La réponse des cellules beta aux stimuli primaires peut être modifiée par un large spectre d'hormones, de substrats énergétiques et de neurotransmetteurs qui amplifient, ou plus occasionnellement inhibent, les réponses induites par les nutriments. Ces agents sont souvent considérés comme des 'potentialisateurs' (ou des stimuli secondaires) de la sécrétion insulinaire (23; 25). Voici ci-dessous une liste des principaux mécanismes permettant à la cellule beta de percevoir et de répondre de manière appropriée aux stimuli primaires (et potentialisateurs) de la sécrétion insulinaire :

- **Réponse insulino-sécrétoire au glucose.** Le glucose est non seulement l'agent stimulant le plus puissant, mais il conditionne en outre la réponse sécrétoire à tous les autres stimuli (effet dit « permissif » du glucose) (25). Les deux caractéristiques majeures de la réponse insulino-sécrétoire au glucose de la cellule beta consistent en sa sensibilité et sa rapidité d'exécution. Dans un éventail de concentrations physiologiques, la courbe dose-réponse induite par le glucose sur la sécrétion insulinaire (mesurée à partir d'îlots isolés) est non linéaire mais sigmoïdale (**Figure 13**) (23). Une concentration de glucose extracellulaire inférieure à 5mmol/l ne perturbe pas la sécrétion d'insuline. Le taux de sécrétion augmente progressivement pour des concentrations de glucose comprises entre 5 et 20mmol/l. La réponse semi-maximale insulino-sécrétoire est observée pour une concentration de glucose comprise entre 9 et 11mmol/l (23; 25). Un déplacement, même infime, de la courbe vers la droite (effets de stimuli secondaires atténuateurs) ou la gauche (effets de stimuli secondaires amplificateurs) peut modifier de manière importante la quantité d'insuline sécrétée.

La réponse insulino-sécrétoire à une stimulation constante glucidique (≥ 20 mmol/l) est caractérisée au cours du temps par une première phase de sécrétion très élevée mais transitoire (2-3 minutes), suivie par une seconde phase un peu plus faible mais davantage maintenue dans le temps jusqu'à l'arrêt de la stimulation (**Figure 14**) (23). Cette réponse biphasique s'observe *in vitro* sur îlots ou pancréas isolés et perfusés, et *in vivo* en utilisant des clamps hyperglycémiques. La signification physiologique du caractère biphasique de la sécrétion insulinaire n'apparaît encore pas tout à fait clairement, mais le rôle du pic précoce de sécrétion serait de sensibiliser les tissus cibles aux effets de l'insuline et d'empêcher une hyperinsulinémie trop prononcée suivie d'une hypoglycémie réactionnelle (25). Sur le plan cellulaire, l'interprétation de la réponse biphasique fait l'objet de nombre de controverses. L'explication la plus consensuelle serait de penser que la première phase reflète l'exocytose de granules matures d'insuline d'ores et déjà au contact de la membrane plasmique, alors que

la deuxième phase correspondrait à la libération d'insuline nouvellement synthétisée et provenant d'autre part de granules plus éloignées de la membrane (25).

- **Détection et métabolisme élevés du glucose dans les cellules beta.** Les cellules beta pancréatiques ont la capacité de répondre à de fins changements de glycémie dans une gamme physiologique très étroite. Le glucose est intégré (suivant son gradient de concentration) dans la cellule beta via une diffusion facilitée par des transporteurs à haute capacité et faible affinité pour le glucose (GLUT1, et surtout GLUT2 avec un Km d'environ 17mM) (47), entraînant un équilibre très rapide entre les concentrations de glucose extra- et intracellulaires. Une fois entré dans la cellule beta, le glucose est directement phosphorylé en glucose-6-phosphate (G6P) par la glucokinase (GCK ; hexokinase 4) (**Figure 15**) (48). La cinétique de cette enzyme est particulière car elle implique une très faible affinité pour le glucose (Km élevé d'environ 8mM), une coopérativité avec ce substrat et une quasi-absence d'inhibition du G6P à des concentrations physiologiques normales (49; 50). Cette étape de phosphorylation du glucose par la GCK est considérée comme limitante dans le flux glycolytique de la cellule beta. La GCK est ainsi considérée comme un « détecteur de glucose » (*glucose sensor*) qui intègre la glycémie de l'organisme et le métabolisme du glucose dans la cellule beta couplé à la sécrétion insulinaire (48; 50). Une fois phosphorylé, le glucose est métabolisé via la glycolyse et la respiration oxydative. Le métabolisme du glucose dans la cellule beta est à l'origine d'une production accrue de protons (H^+), d'équivalents réduits (NADH, NADPH...) et surtout d'intermédiaires phosphorylés à haute énergie avec en tête de liste l'adénosine triphosphate (ATP) (**Figure 15**) (50).

- **Canaux potassium sensibles à l'ATP (K^+ -ATP) et dépolarisation transmembranaire dans la cellule beta.** En absence de glucose extracellulaire, le potentiel membranaire de la cellule beta est maintenu à environ -70mV, essentiellement par l'efflux d'ions K^+ (suivant son gradient de concentration) (25). Au niveau de la membrane des cellules beta, il existe plusieurs types de canal K^+ et plus particulièrement le canal K^+ -ATP dont l'activité est inhibée par l'ATP. Ce canal est également la cible pharmaceutique de sulfonylurées dont le correspondant endogène serait une protéine, connue sous le nom d'endosulfine, présente dans de nombreux tissus équipés de canaux K^+ -ATP (comme le système nerveux) (51). Le canal K^+ -ATP de la cellule beta est un hétéro-octamère formé de quatre sous-unités représentant le canal potassique (Kir6.2) qui ménagent un passage par lequel transitent les ions K^+ , enserré de quatre autres sous-unités jouant un rôle de régulateur du canal (SUR1) (**Figure 16**) (23; 52). L'ATP et les sulfonylurées induisent la fermeture du pore du canal en se fixant respectivement sur les sous-unités Kir6.2 et SUR1, alors que l'adénosine diphosphate (ADP)

active l'ouverture du canal en se fixant à un domaine localisé sur SUR1. La diazoxide, connu comme un inhibiteur de la sécrétion insulinaire, se lie aussi aux sous-unités SUR1 entraînant une ouverture du canal. Ainsi, la propriété du canal K^+ -ATP est central dans le lien entre le métabolisme glucidique de la cellule beta et la sécrétion insulinaire : la génération d'ATP consécutive au métabolisme glucidique, parallèlement à la diminution de la concentration d'ADP (d'où une élévation du rapport ATP/ADP), entraîne la fermeture des canaux K^+ -ATP ; ce qui cause une réduction franche de l'efflux d'ions K^+ conduisant à une dépolarisation transmembranaire de la cellule beta et à un influx massif des ions Ca^{2+} via les canaux calciques voltage-dépendants de type L (CCVDL) (23). Le phénomène est amplifié par le fait que l'entrée de Ca^{2+} induit elle-même une nouvelle dépolarisation. L'ampleur et le sens du gradient de concentration de ces mouvements ioniques entraînent une augmentation considérable de la concentration intracytosolique de Ca^{2+} (cf **Figure 15**) (23).

- Contrôle de la concentration intracytosolique de calcium dans la cellule beta. Le calcium intracellulaire est l'effecteur principal de la réponse insulino-sécrétoire induite par le glucose, associant la dépolarisation transmembranaire à l'exocytose. La quantité totale de calcium dans la cellule beta est de l'ordre de 20 à 30 mmol par gramme de tissu sec (25). La concentration cytosolique de l'ion Ca^{2+} est très faible en comparaison de sa concentration cellulaire totale et de sa concentration extracellulaire. Cette observation s'explique par le fait qu'un gradient très élevé d'ions Ca^{2+} (d'environ 10 000×) est maintenu de part et d'autre de la membrane plasmique de la cellule beta via une combinaison de systèmes associés à la membrane expulsant les ions Ca^{2+} (par un transport actif faisant appel à une pompe Ca^{2+} /ATP dépendante, dont l'énergie provient de l'hydrolyse de l'ATP par une ATPase elle-même activée par les ions Ca^{2+} cytosolique) et une séquestration active des ions Ca^{2+} au sein des organelles intracellulaires (soit par à une ATPase différente de celle de la membrane plasmique mais ayant le même fonctionnement, soit par un échangeur Na^+/Ca^{2+}) (23). La principale voie par laquelle la concentration de Ca^{2+} augmente dans le cytosol de la cellule beta est l'influx d'ions Ca^{2+} extracellulaires via les CCVDL s'ouvrant en réponse à une dépolarisation transmembranaire. Des études basées sur des cellules beta perméabilisées ont montré qu'une élévation seule d'ions Ca^{2+} intracellulaires suffit à initier la sécrétion insulinaire, et que les conditions qui augmentent la concentration intracellulaire de Ca^{2+} stimulent la libération d'insuline (53). L'augmentation de la concentration cytosolique de Ca^{2+} est en outre essentielle à l'initiation de la sécrétion insulinaire en réponse au glucose : empêcher l'influx de Ca^{2+} en enlevant les ions Ca^{2+} extracellulaires ou bloquer les CCVDL par des drogues enrayent la sécrétion d'insuline induite en réponse au glucose (23).

L'élévation en ions Ca^{2+} intracellulaires agit sur la sécrétion d'insuline via différents capteurs d'ions Ca^{2+} dans la cellule beta comme les protéines kinases calcium dépendantes (kinases à chaînes légères de myosine, kinases calcium/phospholipide dépendantes, kinases calcium/calmoduline dépendantes) ou les phospholipases A_2 cytosoliques (cPLA₂) (23). Ces capteurs d'ions Ca^{2+} seraient à la fois importants dans l'initiation de la sécrétion insulinaire mais aussi dans les phases terminales où les synaptotagmines sensibles aux ions Ca^{2+} sont impliquées dans la formation du complexe SNARE lors de l'exocytose (cf supra ; partie II.1/b) et où elles confèreraient ainsi la sensibilité d'ions Ca^{2+} au taux de sécrétion des granules.

L'élévation en ions Ca^{2+} intracellulaires induite par le glucose (et d'autres nutriments) active d'autres effecteurs dans la cellule beta comme les isoformes de l'adénylate cyclase sensibles au calcium générant de l'AMPc à partir d'ATP, et la phospholipase C (PLC) entraînant la génération d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et de diacylglycérol (DAG), tous deux médiateurs de la sécrétion d'insuline (23). La génération d'IP₃ conduirait à une mobilisation rapide d'ions Ca^{2+} cytosoliques à partir de régions du réticulum endoplasmique reconnaissant l'IP₃ par des récepteurs spécifiques (54). Sa liaison provoque l'ouverture des canaux calciques, qui libèrent les ions Ca^{2+} dans le cytosol par diffusion passive. Le DAG quant à lui activerait certains isoformes de la protéine kinase C (PKC) favorisant le stimulus sécrétoire (25). Enfin, l'AMPc est connu pour potentialiser l'effet insulino-sécrétoire du glucose : l'AMPc influencerait la sécrétion insulinaire via l'activation de la protéine kinase A (PKA) AMPc dépendante qui peut activer (en les phosphorylant) certaines protéines clés du cytosquelette dans l'exocytose, ou via les facteurs d'échange de guanine régulés par l'AMPc (plus connus sous le nom d'EPAC pour *exchange proteins activated by cyclic AMP*) impliqués aussi dans l'exocytose (**Figures 17 et 18**) (23; 55).

- La voie indépendante des canaux K^+ -ATP ou voie « amplificatrice » dans la cellule beta. Plusieurs études ont montré que quand la concentration de Ca^{2+} est augmentée par dépolarisation transmembranaire, tout en maintenant ouverts les canaux K^+ -ATP par un traitement à la diazoxide, le glucose est toujours capable de stimuler une sécrétion insulinaire. Le mécanisme expliquant cette observation n'a toujours pas été franchement établi : des effecteurs comme le glutamate, la leucine, le malonyl-CoA, l'acide arachidonique (généralisé par les cPLA₂ qui hydrolysent la phosphatidylcholine) ou les prostaglandines restent des pistes non confirmées (25).

- Les acides aminés. Plusieurs acides aminés peuvent activer la sécrétion insulinaire *in vitro* et *in vivo*, la plupart en collaboration avec le glucose mais certains comme la leucine, la lysine

et l'arginine, peuvent stimuler la sécrétion d'insuline en absence de glucose, et donc jouer un rôle de stimulus primaire ou d'initiateur de la sécrétion (23; 25). La leucine est métabolisée par la cellule beta et exerce ainsi les mêmes effets (quoiqu'inférieurs) sur le potentiel membranaire, les flux ioniques et la sécrétion d'insuline que ceux du glucose (56). Aussi la leucine pourrait activer la voie indépendante des canaux K^+ -ATP (cf supra). La lysine et l'arginine sont quant à elles des acides aminés chargés positivement qui traversent la membrane des cellules beta via des transporteurs spécifiques aux acides aminés cationiques. L'accumulation de ces acides aminés dépolariserait la membrane conduisant à un influx de Ca^{2+} (23).

- **Les acides gras non estérifiés (AGNE).** Dans des conditions physiologiques normales, les AGNE potentialisent la sécrétion d'insuline induite par le glucose (57). La longueur de la chaîne aliphatique et le degré d'insaturation influent sur leurs effets insulino-sécréteurs (58). Ainsi, les AGNE à chaîne longue tels que l'acide palmitique ou l'acide linoléique amplifient la sécrétion d'insuline en réponse à de faibles concentrations de glucose (3mmol/l). Les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces effets restent discutés à ce jour mais les acyl-CoA, l'un des métabolites intracellulaires des AGNE, auraient un rôle déterminant (25). Plusieurs mécanismes peuvent rendre compte de l'effet stimulant des acyl-CoA sur la sécrétion insulinique : **i/** ils favorisent directement l'exocytose en facilitant la fusion des granules avec la membrane plasmique des cellules beta ; **ii/** ils augmentent les acylations ce qui contribue à l'activation de certaines voies de signalisation notamment celles qui font appel aux protéines G (comme GPR40) ou aux protéines à activité tyrosine kinase de la famille Src ; **iii/** ils activent la PKC etc... (25)

- **Les hormones insulaires.** Comme abordé précédemment, il existe des interactions intra-îlot, via un ensemble de différentes hormones libérées par toutes les cellules endocrines, qui peuvent affecter de différentes façons la sécrétion insulinique des cellules beta.

L'insuline tout d'abord a un effet rétroactif autocrine et/ou paracrine sur la cellule beta qui exprime les récepteurs à l'insuline et les éléments de signalisation intracellulaires associés. Cet effet régulerait l'expression du gène *INS* et la masse des cellules beta via un impact sur leur prolifération et leur apoptose. En outre, l'effet rétroactif de l'insuline passerait par l'ouverture des canaux K^+ -ATP via une voie de signalisation IP_3 dépendante, conduisant donc à une hyperpolarisation de la membrane plasmique et ainsi à un frein de l'entrée des ions Ca^{2+} dans la cellule (25).

Le glucagon active la sécrétion d'insuline des cellules beta via l'activation de l'adénylate cyclase couplée à la protéine G stimulatrice (G_s) et l'augmentation consécutive d'AMPc intracellulaire (**Figure 19**) (23).

La somatostatine (SST) est sécrétée par les cellules delta des îlots de Langerhans mais aussi par de nombreux autres sites, incluant le système nerveux central et les cellules D localisées dans l'appareil digestif, qui produisent différents isoformes de SST. Les îlots expriment cinq différents sous-types de récepteurs à la SST (SSTR) (23). La SST sécrétée par les cellules delta a un effet d'inhibition très sévère sur les sécrétions d'insuline et de glucagon, via les activations respectives des récepteurs SSTR5 et SSTR2. Les SSTR activés se couplent à la protéine G inhibitrice (G_i), ce qui conduit à l'inhibition de l'adénylate cyclase entraînant une diminution de la formation d'AMPc, et à une hyperpolarisation de la membrane entraînant une diminution de la concentration cytosolique de Ca^{2+} (**Figure 19**) (59; 60).

La ghréline aurait un rôle inhibiteur sur la réponse insulino-sécrétoire au glucose dans les cellules beta, de la même façon que la SST (23; 61).

- Le système nerveux dans la sécrétion d'insuline. Les nombreuses fibres parasympathiques qui innervent les îlots de Langerhans sont post-ganglionnaires et proviennent des ganglions localisés au sein même du pancréas, qui sont contrôlés par des fibres nerveuses pré-ganglionnaires provenant des centres vagues dorsaux (cf **Figure 6**) (62). L'acétylcholine constitue le principal neurotransmetteur parasympathique post-ganglionnaire, qui amplifie les libérations d'insuline et de glucagon (62). Dans les cellules beta, l'acétylcholine active la PLC via les récepteurs muscariniques M3 et M4 (couplés à une protéine G_q), générant l' IP_3 et le DAG qui amplifient les effets du glucose en augmentant la concentration cytosolique d'ions Ca^{2+} et en activant la PKC (**Figure 20**) (63; 64). L'activation des récepteurs muscariniques situés à la surface des cellules beta peut aussi entraîner l'activation de la cPLA₂ générant l'acide arachidonique qui peut augmenter davantage la sécrétion induite par le glucose et d'autres nutriments. Par ailleurs, l'acétylcholine dépolarise la membrane plasmique en affectant la conductivité des ions Na^+ . Cette dépolarisation induit une augmentation soutenue d'ions Ca^{2+} au sein de la cellule beta et donc une libération insulinique (64). Les fibres parasympathiques innervant les îlots de Langerhans contiennent nombre de neuropeptides biologiquement actifs, incluant le polypeptide intestinal vasoactif (VIP), le polypeptide activant l'adénylate cyclase pituitaire (PACAP) et le polypeptide libérant la gastrine (GRP), qui sont délivrés lors d'une activation vagale et qui stimulent, comme l'acétylcholine, les sécrétions d'insuline et de glucagon (cf **Figure 6**) (65). Le VIP et le PACAP sont fortement exprimés dans les fibres parasympathiques qui innervent les îlots de Langerhans et l'appareil

digestif. Ces deux neuropeptides ont des structures très similaires et les récepteurs VIP1 et VIP2 ont une certaine affinité pour le PACAP (65). Les effets *in vivo* et *in vitro* du VIP et du PACAP sur la sécrétion insulinaire passent respectivement par les récepteurs VIP2 et PAC1, et impliquent des augmentations en AMPc intracellulaire et en ions Ca^{2+} (65). Les effets du GRP sont quant à eux régulés par des récepteurs spécifiques couplés à une protéine G_q , et impliquent l'activation de la PLC et la génération d' IP_3 et de DAG (cf **Figure 20**) (66).

Les îlots de Langerhans reçoivent par ailleurs une innervation sympathique extensive partant de fibres post-ganglionnaires dont les centres nerveux sont situés dans les ganglions cœliaques ou paravertébraux, alors que les neurones pré-ganglionnaires proviennent de l'hypothalamus (cf **Figure 6**) (62). Le neurotransmetteur sympathique principal, la norépinephrine (ou noradrénaline), peut exercer un impact positif ou négatif sur la sécrétion insulinaire. En effet, la norépinephrine exerce un effet activateur direct sur la cellule beta via les adrénorécepteurs β_2 , ou un effet inhibiteur via les adrénorécepteurs α_2 , et son effet final dépend de l'expression relative de ces sous-types de récepteurs à la surface de la cellule (62). Chez l'homme, dans des conditions physiologiques normales et *a fortiori* lors d'un stress, l'effet résultant de la norépinephrine est toujours une atténuation de la sécrétion d'insuline (25). L'effet activateur des adrénorécepteurs β_2 se produit via la stimulation de l'adénylate cyclase et l'augmentation constitutive de l'AMPc intracellulaire, alors que l'effet inhibiteur des adrénorécepteurs α_2 aboutit à la mobilisation de protéines G_i , et implique une réduction de l'AMPc et d'ions Ca^{2+} cytosoliques. Par ailleurs, des catécholamines circulantes sécrétées par la médullo-surrénale (principalement l'épinephrine ou adrénaline) semblent aussi avoir un impact sur la sécrétion insulinaire via des interactions avec les adrénorécepteurs (23). Comme les neurones parasympathiques, les neurones sympathiques innervant les îlots de Langerhans contiennent nombre de neuropeptides biologiquement actifs, incluant la galanine et le neuropeptide Y (NPY) (cf **Figure 6**), qui pourraient jouer un rôle dans l'inhibition de la sécrétion insulinaire à la fois basale et stimulée par le glucose (et d'autres nutriments) (59). Le NPY et la galanine affectent la sécrétion insulinaire via les récepteurs couplés à la G_i qui une fois activés, inhibent l'adénylate cyclase, et il semblerait en outre que la galanine ait des effets inhibiteurs supplémentaires à une étape plus tardive de l'exocytose (23).

- **L'axe entéro-insulaire et ses incrétones.** Depuis plus de 40 ans, il a été observé que la sécrétion insulinaire est plus importante après une administration orale de glucose plutôt qu'intraveineuse (67; 68). Il est aujourd'hui reconnu que cette observation est due à la libération d'hormones gastro-intestinales, les incrétones (68). Les incrétones majeures impliquées dans une augmentation de la réponse insulino-sécrétoire des cellules beta après un

repas sont le GLP1 (*glucagon-like peptide 1*), le GIP (*glucose-dependent insulintropic peptide*) et la cholécystokinine (CCK), tous sécrétés par des cellules endocrines gastro-intestinales spécialisées, en réponse à une absorption de glucose et d'autres nutriments (68).

Après un repas, le GLP1 est sécrété par les cellules L du jéjunum et de l'iléon (parties distales de l'intestin), en réponse à une augmentation de la concentration de nutriments dérivés de carbohydrates, lipides et protéines dans le lumen intestinal. Le GLP1 est produit par un mécanisme de clivage protéolytique différentiel de la molécule de prépro-glucagon (**Figure 21**) (69). Plus particulièrement, le GLP1 est généré via le clivage du prépro-glucagon par la prohormone convertase 1-3 dans les cellules L, puis dégradé par la DPP-4 (*dipeptidyl protease 4*) qui coupe deux acides aminés dans la partie N-terminale du GLP1 (69). Le GLP1 dans son intégralité (1-37) ne montre aucune activité biologique, mais les peptides tronqués GLP1 (7-36) et GLP1 (7-37) ont la capacité de stimuler la sécrétion insulinaire *in vivo* et *in vitro* via des récepteurs couplés à la protéine G_s activant l'adénylate cyclase (**cf Figure 19**) (70). Bien que la voie de l'AMPc ait été montrée comme impliquée dans la majorité de effets du GLP1 dans les îlots de Langerhans, le GLP-1 engendrerait en outre la fermeture des canaux K^+ -ATP indépendamment de la voie de l'AMPc (70).

Le GIP est sécrété par les cellules K du duodénum (région initiale de l'intestin) en réponse à l'absorption de glucose, d'autres sucres, d'acides aminés et d'acides gras à longues chaînes. Il a été nommé originellement 'le peptide inhibiteur gastrique' car il avait des effets inhibiteurs sur la sécrétion d'acide dans l'estomac, mais ses principaux effets physiologiques sont de stimuler la sécrétion insulinaire en réponse au glucose (68). Comme le GLP1, le GIP se fixe aux récepteurs couplés à la protéine G_s avec les mêmes cascades de signalisation en aval. Il semble que le GIP stimulerait aussi la sécrétion d'insuline par la production d'acide arachidonique via l'activation de la cPLA₂, et par la fermeture des canaux K^+ -ATP (68).

La CCK est sécrétée par les cellules I du duodénum en réponse à des concentrations élevées en graisse et protéines. La forme tronquée CCK8 stimule la sécrétion insulinaire *in vitro* et *in vivo* via des récepteurs spécifiques couplés à la protéine G_q qui activent la PLC puis la PKC (**cf Figure 20**) (23). Cependant, il est à noter que de hautes concentrations en CCK sont requises pour activer la sécrétion d'insuline, et il est possible que la fonction majeure de la CCK se concentre dans la digestion intestinale (23).

- L'implication des rythmes circadiens. Le schéma de sécrétion insulinaire tout au long de la journée est bien plus compliqué que celui perçu lors d'un stress glycémique provoqué par des expériences de clamp hyperglycémique. En effet, *in vivo*, la sécrétion d'insuline suit des pulsations, à la fois rapides et longues (oscillations dites 'ultradiennes'). Les oscillations

rapides correspondent à des jaillissements en série de sécrétion insulinaire. Ces jaillissements rapides se déroulent toutes les 5-15 minutes et représentent la grande majorité de la part totale de la sécrétion insulinaire chez l'homme (71). Par ailleurs, une stimulation de la sécrétion d'insuline par le GLP-1 (72), les sulfonylurées (73) ou une prise orale de glucose (74) est visible par une augmentation franche de l'amplitude de ces oscillations rapides, et inversement en utilisant de la somatostatine (75) ou le facteur de croissance IGF1 (76). Les oscillations rapides se superposent aux oscillations ultradiennes qui se déroulent toutes les 80-150 minutes. Ces oscillations bien plus lentes sont présentes à l'état basal et comme les oscillations rapides, elles sont amplifiées après un repas (77). Les mécanismes sous-jacents expliquant cette horloge moléculaire dans les îlots pancréatiques étaient jusqu'à peu complètement méconnus. Dernièrement, l'équipe de Joseph Bass à Chicago a montré que les îlots pancréatiques renfermaient leur propre horloge interne basée sur les gènes circadiens et les protéines d'oscillations dépendants des facteurs de transcription CLOCK et BMAL1 (78).

→ Des altérations de la fonction des cellules beta sont évidentes lorsqu'un DT2 est déclaré. Par exemple, dans l'étude britannique '*UK Prospective Diabetes Study*', l'évaluation de la fonction des cellules beta utilisant un modèle d'évaluation de l'homéostasie à jeun (HOMA) a indiqué que la fonction de la cellule beta au moment même du diagnostic était déjà diminuée de 50% et continuait à se dégrader inexorablement, plus ou moins rapidement selon les modes de traitement (**Figure 22**) (79). Les anomalies généralement reconnues incluent en outre une absence de la première phase et une diminution de la seconde dans la libération d'insuline par les cellules beta en réponse à une hyperglycémie (lors de clamps hyperglycémiques) (33; 80). Les réponses à une ingestion de repas successifs et à des stimuli non-glucidiques sont retardées, voire annulées, avec une diminution de la capacité sécrétoire maximale (80; 81).

Nombre d'études ont montré qu'une hyperglycémie grave et/ou prolongée peut altérer la fonction des cellules beta (phénomène dit de 'glucotoxicité') (82; 83). En outre, une amélioration du contrôle glycémique par la prescription de sécrétagogues, de sensibilisateurs à l'insuline ou même d'insuline, améliore la fonction des cellules beta chez les patients atteints de DT2. Les mécanismes expliquant le fait qu'une hyperglycémie exerce un effet délétère sur les cellules beta sont complexes et multifactoriels. Il a été rapporté que ces mécanismes pouvaient impliquer une production croissante d'espèces réactives oxygénées ou radicaux libres (ROS pour *reactive oxygen species*) au sein des cellules beta, une altération de la transcription de gènes et de l'expression de protéines (ex. PDX1, MAFA) induite par le

stress oxydatif, et une augmentation de l'apoptose des cellules beta (84). Il est toutefois important de noter que comme la dysfonction des cellules beta est génétiquement prédisposée chez des individus normoglycémiques, et comme l'optimisation du contrôle glycémique ne peut rétablir complètement les fonctions des cellules beta chez des sujets atteints de DT2, la glucotoxicité est clairement un phénomène secondaire de la maladie mais un phénomène qui peut toutefois accélérer la détérioration des cellules beta dans la durée (84).

En plus d'une hyperglycémie, les patients atteints de DT2 montrent une augmentation de leur concentration plasmatique en AGNE, comme chez les individus obèses. L'augmentation de la concentration des AGNE chez les individus obèses est principalement due à leur masse grasseuse plus élevée (85). Il a été montré que les individus obèses atteints de DT2 avaient une concentration d'AGNE plus élevée que les individus obèses non-diabétiques. Cette observation n'est pas due à une libération accrue d'AGNE dans le sang, mais plutôt à une diminution de leur clairance (86). Nombre d'études *in vitro* et portées sur les animaux ont démontré qu'une élévation prolongée de la concentration en AGNE altère la fonction de la cellule beta en inhibant la sécrétion insulinaire en réponse au glucose (via la protéine mitochondriale UCP2), en altérant l'expression de *INS* (via l'augmentation de la céramide altérant la fixation des facteurs de transcription PDX1 et MAFA) et, de manière plus importante, en provoquant l'apoptose des cellules beta (87; 88). Ce phénomène est connu sous le nom de 'lipotoxicité'. Cependant, rien n'a pu être montré chez l'homme. Certaines études suggèrent que l'effet des AGNE ne serait délétère qu'en présence d'une hyperglycémie. Ainsi, il a été suggéré d'utiliser davantage le terme 'glucolipotoxicité' plutôt que lipotoxicité pour décrire l'effet délétère des AGNE chez les sujets atteints de DT2 (84).

Par ailleurs, les patients atteints de DT2 ont une stimulation inappropriée des incrétines. En effet, les sujets diabétiques de type 2 montrent des concentrations plasmatiques de GIP après un repas supérieures à celles mesurées chez des individus non-diabétiques (89). Par contre, les différences de concentrations de GLP1 n'ont été montrées que modestes entre patients atteints de DT2 et sujets non-diabétiques. Néanmoins, l'effet incrétine est altéré lors d'un DT2. Les réponses de l'insuline au GLP1 et au GIP sont réduites (33; 90). Il n'est pas clairement établi toutefois qu'un effet incrétine défectueux soit simplement la manifestation d'une réduction généralisée de la fonction de la cellule beta comme l'est la réduction de la réponse insulinaire à l'arginine. Cependant, les traitements antidiabétiques (inhibiteurs de la DPP-4 ou analogues du GLP1) qui augmentent l'activité des incrétines ou leurs concentrations ont été montrés efficaces pour baisser la glycémie chez les sujets atteints de DT2 (91).

Des anomalies dans l'oscillation de la sécrétion insulinaire ont aussi été rapportées. Les pulsations, à la fois rapides et ultradiennes, sont diminuées et moins régulières. Les pulsations ultradiennes sont moins amplifiées après les repas et elles ont tendance à ne plus suivre les oscillations de la glycémie (**Figure 23**) (71; 77). D'un point de vue plus moléculaire, il a été dernièrement montré que l'inactivation des gènes *CLOCK* et *BMAL1* dans des souris entraînait une intolérance au glucose, une réduction franche de la sécrétion insulinaire (avec une hypoinsulinémie) et une diminution de la taille des îlots qui s'amplifiait avec l'âge (78).

Nombre d'altérations génétiques au niveau de gènes exprimés dans la cellule beta ont été rapportées chez des patients atteints de DT2 (que ce soit dans les formes mono- ou polygéniques). Cela sera davantage étayé dans la partie III. de cette introduction.

2/ D'une action normale de l'insuline à une insulino-résistance observée lors d'un diabète de type 2

NB : Comme précédemment, la physiologie normale sera écrite en noir alors que les événements et mécanismes décrits dans le DT2 seront écrits en violet.

L'insuline est exclusivement synthétisée et sécrétée par les cellules beta pancréatiques. Elle exerce un large spectre d'effets anaboliques dans plusieurs tissus cibles. Pour agir, l'insuline se lie tout d'abord à des récepteurs spécifiques exprimés à la surface des cellules cibles. Le récepteur de l'insuline est exprimé dans la plupart des cellules, mais il est présent plus particulièrement dans les tissus cibles des effets métaboliques de l'insuline comme le foie, les muscles squelettiques et le tissu adipeux. Il est également bien exprimé dans les cellules beta et dans certaines zones du cerveau. Des études d'inactivation spécifique du récepteur dans ces tissus ont montré que l'insuline y exerce des actions importantes dans la régulation de l'homéostasie énergétique (92).

Le récepteur de l'insuline est une glycoprotéine tétramérique, formée de deux sous-unités α extracellulaires et de deux sous-unités β transmembranaires contenant un domaine tyrosine kinase et des résidus tyrosines, essentiels à l'activité biologique du récepteur. La liaison de l'hormone est assurée par les sous-unités α et la partie extracellulaire des sous-unités β , qui contiennent des sites de liaison de haute et de basse affinité pour l'insuline (**Figure 24**) (93). La fixation de l'insuline induit des modifications conformationnelles des sous-unités α et β , qui permettent l'accès au site catalytique et la transphosphorylation des

résidus tyrosines des sous-unités β (94) (**Figure 24**). La phosphorylation de ces résidus est nécessaire à l'activation du récepteur, phosphorylant ainsi ses substrats intracellulaires incluant les protéines de la famille des IRS (*insulin receptor substrate*), de la famille des protéines Shc (*Src homology 2 containing protein*) et quelques autres substrats dont la fonction n'a toujours pas été clairement établie tels que les protéines Gab1, Cbl, APS et p60^{dok} (93; 94).

Les IRS sont les substrats immédiats du récepteur de l'insuline et sont les plus importants dans l'action de l'insuline. Ils présentent dans leur partie N-terminale des domaines PH (*plextrin homology*) et PTB (*phosphotyrosine binding*) responsables de l'interaction de la protéine avec le résidu phosphotyrosine présent dans la partie juxtamembranaire du récepteur (94). La partie COOH-terminale des IRS contient nombre de résidus tyrosines, qui sont phosphorylés par le récepteur, puis qui se lie à d'autres protéines intracellulaires contenant des domaines SH2 (*Src homology 2*). Ces protéines peuvent servir de molécules adaptatrices comme les sous-unités régulatrices de la PI₃ (*phosphatidyl inositol 3*) kinase et la protéine adaptatrice Grb2, ou d'enzymes ayant des activités kinases ou phosphatases comme la tyrosine phosphatase SHP2 (*SH2 domain containing tyrosine phosphatase 2*) et la tyrosine kinase cytoplasmique Fyn (94). Via des liaisons non-covalentes avec nombre de protéines renfermant des domaines SH2, les IRS servent de points d'ancrage et d'interaction avec les molécules impliquées dans les cascades de transduction en aval. Ainsi, les IRS incarnent un point de divergence majeur dans la cascade de signalisation insulinique, en entraînant par exemple l'activation des voies de signalisation mitogènes (Ras / MAP kinase) ou métaboliques (PI₃ kinase / PDK1) (**Figure 25**) (93).

Depuis 10 ans, il est devenu évident que la perception de la signalisation insulinique comme étant une cascade linéaire d'activation de signaux de transduction, est dépassée. De façon plus rigoureuse (mais plus complexe aussi), l'image de l'action insulinique est vue aujourd'hui comme un ensemble de modifications au sein d'un réseau d'interactions impliquant une matrice de cascades de signalisation qui s'enclenchent en s'interférant (**Figure 25**) (93). L'action biologique finale représente la somme globale des effets des différentes voies de signalisation facilitatrices, inhibitrices et complémentaires qui interagissent avec des systèmes fonctionnels terminaux spécifiques des tissus cibles. Bien qu'il existe des similitudes dans les réseaux de transduction des signaux insuliniques, les différents tissus cibles de l'hormone expriment nombre de systèmes effecteurs uniques, entraînant des fonctions biologiques spécifiques de ces tissus en réponse à l'insuline. Les systèmes effecteurs incluent des enzymes limitantes, des voies de signalisation enzymatique, des

systèmes de transport membranaire, l'expression des gènes, les processus impliquant le transport cellulaire des protéines et des vésicules, et les systèmes régissant la translation, les modifications post-translationnelles et la dégradation des protéines. Au total, la nature des actions biologiques stimulées par l'insuline varie considérablement d'un tissu à un autre, et la grande majorité de ces variations n'est pas le fruit d'un ensemble de différences dans la transmission même du signal insulinaire. Ces variations sont plutôt dues à des effets spécifiques des tissus, expliqués principalement par des systèmes effecteurs uniquement exprimés dans une gamme de cellules cibles différenciées (93). L'action de l'insuline dans la régulation de l'homéostasie énergétique implique principalement le foie, le muscle squelettique et le tissu adipeux.

→ En plus des altérations de sécrétion insulinaire des cellules beta pancréatiques, un patient atteint de DT2 montre une insulino-résistance des tissus cibles qui peut être définie comme l'incapacité de l'insuline à produire ses actions biologiques habituelles (à des concentrations physiologiques normales). Outre une diminution, voire une suppression, de la première phase de sécrétion d'insuline (cf supra ; partie II.1/), les individus qui progressent d'un état normal à un DT2 montrent une diminution franche de leur sensibilité à l'insuline. Outre l'environnement sédentaire et occidentalisé, cette diminution de la sensibilité à l'insuline serait due à des altérations génétiques, semble-t-il toutefois beaucoup plus faibles que celles impliquées dans l'altération de la sécrétion insulinaire (cf infra ; partie III.). Mais ce constat peut encore évoluer...

a) Le foie

En période postabsorptive, le foie contribue de façon majoritaire à la production de glucose (200g/jour pour un homme de 70kg soit ~75% du glucose libéré dans la circulation) et il est le seul organe à assurer la fonction de « glucostat » (95). L'insuline régule le métabolisme hépatique via d'importantes modifications enzymatiques post-translationnelles (comme la phosphorylation) et via des changements dans l'expression des gènes. La stimulation de la formation de glycogène et la régulation de la gluconéogenèse par l'insuline sont les déterminants majeurs de la production hépatique de glucose (**Figure 26**) (93).

- **Glycogénèse / glycogénolyse.** Sous des conditions de stimulation insulinaire, la grande majorité de la capture glucidique est stockée sous forme de glycogène. L'insuline stimule la synthèse de glycogène dans le muscle, le tissu adipeux et le foie, en activant la glycogène

synthase qui ajoute un groupe glucosyl activé aux chaînes polysaccharides grandissantes catalysant ainsi l'étape finale de la glycogénèse (93). La régulation de la glycogène synthase est complexe car elle implique de nombreux acteurs. Quoiqu'il en soit, la capacité de l'insuline à stimuler cette enzyme demande une signalisation proximale via l'activation de la PI₃ kinase et la voie Akt / PKB, puis l'inactivation de la GSK3 qui entraîne une réduction franche de la phosphorylation de la glycogène synthase (cf **Figure 26**) (96; 97). Cette réduction de phosphorylation augmente son activité.

- Inhibition de la gluconéogenèse et de la production hépatique de glucose. La production hépatique de glucose est stimulée à jeun par des hormones contre-régulatrices de l'insuline (glucagon, catécholamines et glucocorticoïdes) qui activent la glycogénolyse et la gluconéogenèse. Lors des repas ou en réponse à des injections insuliniques exogènes, la production hépatique de glucose est efficacement arrêtée par l'insuline en inhibant la glycogénolyse et la gluconéogenèse (93). La gluconéogenèse est majoritairement régulée par des changements d'expression de deux gènes codant deux enzymes clés : la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) et la glucose-6-phosphatase (G6Pase). La PEPCK catalyse une des étapes limitantes de la gluconéogenèse, dont l'étape finale produisant le glucose libre est catalysée par la G6Pase. Le glucose est ensuite transporté en dehors du foie via les transporteurs de glucose GLUT2 (cf **Figure 26**) (93). L'expression de la PEPCK est régulée finement par l'AMPc. Le glucagon, les catécholamines et les glucocorticoïdes augmentent la concentration d'AMPc et induisent la PEPCK, alors que l'insuline a l'effet inverse. En plus des effets directs hormonaux sur les hépatocytes, la sortie de glucose est régulée par des substrats gluconéogènes comme le lactate, les acides aminés et les AGNE (93).

Il est important de noter que l'inhibition de la production hépatique de glucose par l'insuline tient majoritairement dans sa capacité à influencer sur la transcription des gènes. L'insuline modulerait ainsi l'expression de plus de 800 gènes au niveau de ses tissus cibles (93). La régulation de la transcription des gènes dépend de l'activité de différents facteurs de transcription (au niveau de séquences précises dans le promoteur des gènes, appelées IRE pour *insulin response elements*) qui est soit directement modulée par les voies de signalisation stimulées par l'insuline, soit indirectement par des substrats métaboliques. Les promoteurs de la G6Pase et de la PEPCK contiennent des IREs où se fixent, entre autres, les facteurs de transcription FOXO3 et surtout FOXO1 (étant l'isoforme le plus exprimé dans le foie et le tissu adipeux) (93). A l'état basal, les protéines FOXO sont localisées dans le noyau et régulent de façon active la transcription des gènes. Après stimulation insulinique, l'activation

de la voie de signalisation Akt / PKB entraîne la phosphorylation des FOXO, suivie de leur dissociation avec leur site de fixation à l'ADN, de leur expulsion du noyau et *in fine* de la forte diminution de l'expression des gènes codant la G6Pase et la PEPCK. Par ailleurs, la protéine SREBP1 (*sterol regulatory element binding protein*), le récepteur nucléaire LXR (*liver X receptor*), le facteur de transcription Sp1 et la protéine co-activatrice PGC1 (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1*) contribuent de façon importante à la régulation des gènes impliqués dans la gluconéogenèse, en présence d'insuline (cf **Figure 26**) (93).

→ **Insulino-résistance dans le foie.** Chez des patients atteints de DT2, des mesures isotopiques de la production de glucose sous des conditions très stables (à jeun) montrent une association significative entre la production de glucose endogène et la glycémie à jeun (98). Cette association est observée malgré une hyperglycémie et une normoinsulinémie ou hyperinsulinémie, et démontre que l'insulino-résistance contribue à l'augmentation de la production basale de glucose dans le foie. Après un repas, l'augmentation des concentrations de glucose et d'insuline, simultanément à une baisse en glucagon, inhibent complètement la production de glucose endogène chez un sujet sain. Chez les patients atteints de DT2, cette inhibition est incomplète dû à l'insulino-résistance hépatique, la déficience en insuline et la sécrétion excessive de glucagon (99). L'insulino-résistance hépatique a été évaluée via des mesures directes de la diminution de l'effet de l'insuline sur l'inhibition de la production hépatique de glucose. Cette altération est finement corrélée au contenu adipeux du foie (100). La production persistante de glucose par le foie constitue la raison principale de la maintenance d'une hyperglycémie après un repas. Sous des conditions post-prandiales toujours, chez un sujet sain, environ 1/3 du glucose est capté par les muscles, 1/3 est oxydé dans le cerveau et 1/3 est stocké dans le foie (101). Chez les patients atteints de DT2, la capacité du foie à stocker le glucose après un repas paraît intacte ou légèrement diminuée (102). De manière globale, le taux d'utilisation de glucose est aussi normal, car l'hyperglycémie en soi compense la stimulation altérée de l'insuline sur la capture du glucose au niveau des tissus périphériques (103). Enfin, le cerveau semble utiliser des quantités similaires de glucose chez les individus sains et les sujets atteints de DT2. Par conséquent, l'hyperglycémie post-prandiale est sûrement due à une suppression incomplète de la production de glucose endogène (103).

Des études *in vivo* et *in vitro* semblent suggérer que l'insuline inhibe la production hépatique de lipoprotéines à très basse densité (VLDL pour *very low density lipoprotein*)

(104; 105). Cet effet est dû non seulement à la diminution de la disponibilité d'AGNE, fruit de l'inhibition de la lipolyse dans les adipocytes (cf infra), mais aussi à un effet direct de l'insuline dans le foie, inhibant l'assemblage et la production de particules de VLDL. Chez les individus atteints de DT2, l'insuline n'inhibe plus cette production de VLDL (105). Ce phénomène serait corrélé à la quantité de graisse située dans le foie et semble être le mécanisme majeur expliquant l'augmentation de la concentration plasmatique des triglycérides chez les patients insulino-résistants atteints de DT2 (103).

Les mécanismes cellulaires expliquant l'insulino-résistance hépatique ne sont pas totalement élucidés à ce jour. Les triglycérides en soi sont inertes et ne peuvent pas expliquer l'insulino-résistance hépatique (103). Des données issues d'études animales suggèrent qu'au moins deux médiateurs lipidiques pourraient l'induire : les céramides et les DAGs (103). Les céramides sont des lipides complexes appartenant à la famille des sphingolipides. Leur structure est basée sur un diol aminé, la sphingosine, et dépend de la disponibilité en acides gras saturés. Les DAGs, qui sont les précurseurs immédiats des triacylglycérols, activent la PKC dans le foie, qui se lie au récepteur de l'insuline et qui diminue la phosphorylation d'IRS2. Ceci entraîne une diminution de la synthèse de glycogène hépatique et une réduction de l'inhibition de la gluconéogenèse hépatique via les voies Akt / GSK3 et Akt / FOXO respectivement (cf **Figure 26**). L'activité de la PKC a été montrée augmentée dans le foie des patients atteints de DT2 (103).

b) Le muscle squelettique

Le muscle squelettique est considéré *in vivo* comme le plus gros stock de glucose (sous forme de glycogène) stimulé par l'insuline : il est responsable de près de 80% de la captation du glucose en présence d'insuline et la quantité de glycogène stockée dans les muscles est d'environ 120g chez l'adulte (soit une réserve énergétique de 400 kcal) (95). Lors d'une période de jeûne, les muscles squelettiques consomment préférentiellement les réserves de glycogène ainsi que les acides gras (95). La caractéristique principale de l'action insulinique dans le muscle squelettique est la capacité à stimuler le système effecteur lié au transport du glucose (**Figure 27**) (93). Ce transport du glucose à travers la membrane est facilité par les protéines GLUTs, plus particulièrement GLUT1 et GLUT4 dans le muscle squelettique. A l'état basal, le muscle est un faible consommateur de glucose via le transporteur GLUT1 qui se trouve majoritairement à la surface. GLUT1 facilite la diffusion de glucose à travers la membrane plasmique vers le cytosol où le glucose est immédiatement

phosphorylé par l'hexokinase puis métabolisé (93). A l'état basal toujours, GLUT4 contribue de façon très minime au transport du glucose car plus de 90% de ce transporteur résident dans les membranes intracellulaires, plus particulièrement dans des compartiments tubulo-vésiculaires inductibles (réseau du Golgi et vésicules endosomales situées près de la surface cellulaire) et dans une voie de recyclage endocytose-endosomale (93). L'insuline augmente le transport de glucose en recrutant les transporteurs intracellulaires GLUT4 à la membrane plasmique des cellules en stimulant le réseau d'actine et de microtubules. Cela constitue une étape limitante dans le stockage du glucose stimulé par l'insuline et dans le métabolisme des tissus cibles périphériques (93). Lors de la dissipation du signal insulinaire, la désactivation du transport glucidique est due à une translocation inverse des transporteurs GLUT4 à l'intérieur de la cellule. L'intégralité de la voie de signalisation liant le signal de transduction insulinaire au transport glucidique n'a pas été entièrement élucidée à ce jour (93). Quoiqu'il en soit l'activation du transport est considérablement dépendante de l'auto-phosphorylation des récepteurs à l'insuline, de la phosphorylation des tyrosines situées dans IRS1 et l'activation de la voie de la PI₃ kinase / PDK1 qui contribue à la translocation de GLUT4 à la surface de la cellule (cf **Figure 27**) (93). Il est à noter que GLUT4 constitue le transporteur principal du glucose lors d'une stimulation insulinaire non seulement dans le muscle squelettique mais aussi dans le muscle cardiaque et le tissu adipeux.

Par ailleurs, la contraction des muscles résulte de la translocation de GLUT4 qui stimule le transport du glucose au sein du muscle (106). Ce phénomène peut se produire sans aucun changement de la concentration insulinaire dans le sérum et n'implique pas l'activation des récepteurs à l'insuline et de la voie de la PI₃ kinase / PDK1. La mobilisation des transports GLUT4 par un exercice musculaire implique un autre lot de GLUT4 que celui recruté par l'insuline. Ainsi les effets d'un exercice musculaire et ceux de l'insuline sont en partie additifs (107). Les signaux de transduction impliquant l'exercice musculaire ne sont pas entièrement élucidés, cependant la réponse serait partiellement dépendante de l'augmentation constitutive de 5'AMP intracellulaire, suivie par l'activation de l'AMP kinase (AMPK) (107).

→ *Insulino-résistance dans le muscle squelettique.* Nombre d'études ont montré que la capacité de l'insuline à stimuler *in vivo* le dépôt de glucose est diminuée dans les muscles squelettiques des patients atteints de DT2 comparés à des sujets non-diabétiques (sous des conditions similaires d'âge, de sexe et d'IMC) (103; 108). Cependant, l'hyperglycémie compenserait ce défaut de capture de glucose stimulée par l'insuline, et maintiendrait un taux

d'utilisation absolue du glucose à un niveau normal chez les patients atteints de DT2 comparés à des sujets non-diabétiques (103).

De multiples défauts dans la cascade de transduction insulinique ont été identifiés en aval du récepteur de l'insuline, plus particulièrement au niveau de la phosphorylation d'IRS1 et de l'activation de la PI₃ kinase (109). En outre, la capture de glucose stimulée par l'insuline et modulée par la translocation du transporteur de glucose GLUT4 à la surface, et la stimulation de la phosphorylation de glucose par l'hexokinase 2 sont fortement diminuées chez les patients atteints de DT2 (110; 111).

L'obésité (surtout l'obésité abdominale) et le manque d'activité physique sont les causes majeures d'insulino-résistance dans le muscle squelettique (103). Concernant l'obésité, la diminution de la capture de glucose stimulée par l'insuline serait due à l'augmentation d'AGNE produit par le tissu adipeux et à l'accumulation de graisse dans les myocytes (103). Concernant l'activité physique, plusieurs études prospectives ont montré une association inverse entre l'activité physique et l'incidence de DT2 (112; 113). La sensibilité insulinique de la capture de glucose par le muscle squelettique est directement proportionnelle à la condition physique mesurée par la consommation maximale d'oxygène (VO_{2max}) (103). La diminution de la condition physique dans les muscles de patients atteints de DT2 est caractérisée par une diminution de la densité capillaire et d'une déficience de la phosphorylation oxydative mitochondriale (114).

Par ailleurs, une hyperglycémie seule (indépendamment de l'insuline, des acides gras, ou des hormones contre-régulatrices) peut induire une insulino-résistance dans le muscle squelettique humain (82). L'insulino-résistance induite par cette toxicité glucidique semblerait contribuer à une capture moindre de glucose stimulée par l'insuline chez les patients atteints de DT2 comparés à des sujets non-diabétiques ayant le même âge, sexe et IMC (à des niveaux identiques de glycémie / insulinémie) (103). Le degré d'insulino-résistance chez des patients atteints de DT2 est directement proportionnel à la sévérité de leur hyperglycémie. Cet effet serait dû à une diminution de la translocation des transporteurs du glucose GLUT4 et GLUT1, consécutive d'une suractivation du métabolisme glucidique, et en particulier de la voie conduisant à la synthèse des hexosamines, qui ne concerne pourtant que 2 à 3% du glucose entrant dans les cellules (115). Cette voie permet de former de l'UDP-N-acétylglucosamine utilisé comme substrat pour la synthèse de protéoglycannes, de glycoprotéines et de glycolipides. Des expériences *in vitro* et *in vivo* ont permis d'établir que l'enzyme limitante de la voie de biosynthèse des hexosamines, la GFAT (*glutamine fructose-6-phosphate amino transferase*), est surexprimée chez les patients atteints de DT2, ce qui diminue la sensibilité à

l'insuline de la glycogène synthase (115). Ainsi, l'insulino-résistance induite par la voie des hexosamines chez des patients hyperglycémiques atteints de DT2 pourrait être vue comme un mécanisme compensatoire protégeant les muscles contre une capture trop importante de glucose (103).

c) *Le tissu adipeux*

Le tissu adipeux est le site majeur du stockage de carburant énergétique sous forme de triglycérides : 15kg (soit 100 000 kcal) en moyenne y sont stockés chez l'adulte (95). Par ailleurs, les systèmes effecteurs responsables des effets anaboliques de l'insuline sur la lipogenèse et l'anti-lipolyse sont les événements clés de la biologie des adipocytes (**Figure 28**) (93).

- **La lipogenèse.** L'accumulation de graisse est déterminée par la balance entre la synthèse de triglycérides (capture d'acide gras et lipogenèse) et leur dissolution (lipolyse / oxydation des acides gras). L'insuline est le principal stimulateur de la lipogenèse en augmentant la disponibilité du glycérol et des acides gras pour la synthèse des triglycérides, via une élévation de la capture de glucose dans les adipocytes et l'activation des enzymes glycolytiques et de la lipogenèse (93). Ces enzymes sont régulées par l'insuline via des modifications post-translationnelles et l'altération de l'expression des gènes. Concernant les effets post-translationnels, l'insuline active la voie Akt / PKB par phosphorylation, inhibant GSK3 et augmentant constitutivement l'activité de l'ATP cytrate lyase qui stimule la conversion du citrate en acétyl-CoA dans le cytosol (**Figure 28**) (93). L'acétyl-CoA peut ensuite être utilisé pour la synthèse d'acide gras. Par ailleurs, l'insuline induit l'expression de deux protéines clés de la lipogenèse : l'acide gras synthase (FAS pour *fat acide synthase*) et SREBP1. La FAS est l'enzyme centrale participant à la lipogenèse *de novo* et catalyse la conversion de malonyl-CoA et d'acétyl-CoA en acides gras à longues chaînes. La protéine SREBP1 active nombre de gènes impliqués dans la capture et la synthèse d'acides gras et de triacylglycérides (116).

- **Lipolyse et anti-lipolyse.** La lipolyse dans le tissu adipeux est régulée très finement pour que le partage des carburants énergétiques, du glucose et des AGNE soit adapté aux besoins énergétiques. A jeun, la lipolyse est stimulée et libère des AGNE qui sont le principalement carburant oxydatif pour le foie, le cœur et les muscles squelettiques. Pendant un repas, la lipolyse est inhibée et les adipocytes stockent des triglycérides (93). L'augmentation (après un repas) et la diminution (à jeun) des concentrations d'insuline ont un rôle central dans cette

action d'anti-lipolyse. L'inhibition de la lipolyse par l'insuline est très sensible chez des individus sains. Des hormones régulent la lipolyse dans les adipocytes via l'action coordonnée de deux système effecteurs principaux : la lipase hormono-sensible (HSL pour *hormone sensitive lipase*) et les protéines périlipines qui sont localisées à la surface des gouttelettes lipidiques au sein de la cellule (cf **Figure 28**) (93; 117). Les périlipines et la HSL sont essentielles dans la régulation du dépôt de triglycérides et dans sa mobilisation. En absence de stimulation lipolytique, les périlipines étant situées à la surface des gouttelettes lipidiques, inhibent la lipolyse en jouant un rôle de barrage contre l'hydrolyse des triacylglycérols par les lipases. Quand la PKA est activée, les périlipines deviennent phosphorylées et perdent leur rôle de barrage, ce qui permet à la HSL d'hydrolyser le corps triglycéride de la gouttelette lipidique. Les hormones lipolytiques et anti-lipolytiques exercent des effets opposés sur la HSL et les périlipines en déterminant la disponibilité en AMPc et l'activité de la PKA (118). La capacité de l'insuline à inhiber la lipolyse induite par des hormones est due à sa très grande capacité à diminuer les niveaux d'AMPc intracellulaires et ainsi à réduire l'activité de la PKA. La diminution en AMPc est principalement le résultat de la phosphorylation insuline dépendante (et de l'activation) de la phosphodiesterase 3B (PDE3B) via la voie Akt / PKB (118).

→ *Insulino-résistance dans le tissu adipeux.* Chez les patient atteints de DT2, la concentration en triglycérides est diminuée et la concentration plasmatique d'AGNE est augmentée, au regard des sujets non-diabétiques étudiés à des niveaux comparables d'insuline (119; 120). Cette observation suggère que le tissu adipeux est aussi le siège d'insulino-résistance. Cependant, une lipolyse incontrôlée à un degré tel qu'elle pourrait entraîner une acidocétose ne se produit pas spontanément dans un DT2, car la déficience en insuline n'est pas assez grave (103). Comme nous avons vu précédemment (cf partie II.1/), l'augmentation de la concentration plasmatique d'AGNE aggrave l'hyperglycémie en altérant les cellules beta. En outre, cette augmentation stimule l'oxydation hépatique d'AGNE ainsi que la production hépatique de glucose, plus particulièrement via la gluconéogenèse (103).

=> Conclusion controversée sur les causes physiopathologies du DT2

Qu'est-ce qui apparaît en premier : l'œuf = l'insulino-résistance ou la poule = l'altération de la sécrétion insulinique ?

Pendant de nombreuses années, le DT2 a été considéré comme une maladie de l'insulino-résistance : plusieurs études ont suggéré que l'entrave à l'action de l'insuline était le défaut majeur identifiable chez les sujets à risque de DT2 (121), alors que la fonction pancréatique ne devenait anormale qu'à partir du moment où la glycémie à jeun commençait à s'élever. Il était évoqué deux stades de la maladie : celui de l'insulino-résistance compensée (avec un hyperinsulinisme suffisant pour « compenser » l'obstacle de l'insulino-résistance) et celui de l'insulino-résistance décompensée (où au contraire la sécrétion insulinique est devenue insuffisante) (121). Puis les connaissances se sont faites plus fines et le rôle de l'insuffisance de la sécrétion pancréatique dès le début voire avant la maladie a été avancé et confirmé, notamment grâce aux études génétiques qui ont mis en avant des gènes de susceptibilité au DT2 avant tout exprimés dans les cellules beta (cf infra ; partie III. de cette introduction).

Les études avançant un rôle primaire et majeur de l'insulino-résistance des tissus cibles dans la déclaration d'un DT2 ne prenaient pas en compte :

- i/ l'importance de la dynamique de la sécrétion insulinique,
- ii/ la pertinence de la concentration plasmatique d'insuline au regard du stimulus dominant de la sécrétion d'insuline (c'est-à-dire le niveau de la glycémie),
- iii/ la relation entre la fonction de la cellule beta et l'insulino-résistance.

Pour l'anecdote, de 1921 (année de la découverte de l'insuline) aux années 1960/70, il était inversement répandu que le diabète était le résultat d'une « simple » altération du pancréas à sécréter de l'insuline. Un article paru dans le Lancet en 1962 lançait le début de la controverse (**Figure 29**) (122)... qui a mis plus de 40 ans à se rééquilibrer !

Bien que nombre d'individus insulino-résistants ne développent jamais de DT2, des problèmes de sécrétion de la cellule beta peuvent aussi être repérées chez des sujets normoglycémiques. Par conséquent, il apparaît aujourd'hui que les deux dérèglements soient nécessaires, mais pas suffisants pour atteindre des niveaux d'hyperglycémie tels que le DT2 soit déclaré et que l'un peut apparaître sans l'autre avant la survenue de la maladie (**Figure 30**) (123).

III. ETIOLOGIES GÉNÉTIQUES DES FORMES MONO- ET POLYGÉNIQUES DU DIABÈTE DE TYPE 2 ET STRATÉGIES EMPLOYÉES POUR LES IDENTIFIER

1/ Approche gène candidat

Les gènes candidats sont des gènes codant des protéines d'ores et déjà identifiées qui, d'après leur rôle physiologique clef dans l'homéostasie glucidique, sont supposées contribuer à la maladie.

a) *Forme monogénique de DT2*

Concernant les formes monogéniques de DT2 et plus particulièrement le DN, l'approche gène candidat fut très fructueuse. A vrai dire, au regard des limitations technologiques, pratiquement aucune autre approche n'était envisageable car il n'existe pas de « familles » de DN, ce qui rend impossible les études de liaison familiale (cf infra ; partie III.3/). En effet, la majorité des mutations causales répertoriées à ce jour sont soit *de novo*, soit non totalement pénétrantes (parfois par exemple, un parent porteur de la mutation peut être atteint d'un DT2 commun apparaissant beaucoup plus tard dans la vie). L'approche gène candidat dans le DN fut avant tout focalisée sur des gènes impliqués dans le transport du glucose, le développement et la fonction de la cellule beta, particulièrement la sécrétion insulinaire (124).

Après la sélection d'un gène, les parties codantes, ou exons, sont séquencés à partir de l'ADN de chaque patient. Si une mutation putativement fonctionnelle (c'est-à-dire une mutation faux-sens, non-sens ou encore décalante) est identifiée, elle est ensuite testée dans une population de sujets non-diabétiques. Si la mutation est conservée, le séquençage du gène est envisagé dans d'autres cohortes de DN non élucidé, voire de MODY, et des analyses fonctionnelles de la mutation sont engagées. L'approche gène candidat a permis d'identifier les trois gènes principaux impliqués dans le DN : les deux gènes codant les sous-unités du canal K^+ -ATP *ABCC8* (SUR1) et *KCNJ11* (Kir6.2), et le gène *INS* codant la préproinsuline (14).

Concernant les gènes *ABCC8* et *KCNJ11*, l'hypothèse n'était pas gagnée d'avance. En effet, bien que les protéines codées par ces deux gènes aient un rôle crucial dans la sécrétion d'insuline (cf supra ; partie II.1/), il fallait imaginer des mutations gain-de-fonction qui puissent engendrer un DN. Finalement, cette hypothèse s'est avérée réelle : les mutations

identifiées chez 30-45% des patients atteints de DN, maintiennent les canaux K⁺-ATP ouverts, ce qui inhibe toutes dépolarisations membranaires à la surface de la cellule beta et donc bloque l'entrée des ions Ca²⁺ et *in fine* la sécrétion d'insuline (**Figure 31**). Cette découverte a été cruciale concernant le traitement des patients mutés. En effet, la grande majorité des patients portant une mutation dans *ABCC8* ou *KCNJ11* peuvent passer avec succès d'une insulinothérapie, qui est un traitement lourd et difficilement contrôlable (avec de forts risques d'hypoglycémie), à une simple prise orale de comprimés de sulfonylurées, un ligand du canal K⁺-ATP qui stimule sa fermeture (cf supra ; partie II.1/). De plus amples détails et informations sont étayés dans la revue incluse à la fin de la partie III. de cette introduction (14).

Concernant le gène *INS*, l'hypothèse était cette fois-ci évidente d'autant plus qu'un modèle de souris, la souris 'Akita', portant une mutation hétérozygote dans le gène *Ins2* (détruisant l'un des deux ponts disulfures connectant les chaînes A et B de l'insuline), montre un diabète très précoce non-autoimmunitaire (125). Des mutations faux-sens hétérozygotes ont été identifiées chez 15-20% des patients atteints de DN permanent (14). Par ailleurs, des mutations ont été répertoriées chez des cas ayant une déclaration de diabète un peu plus tardive au cours de l'enfance, voire chez des patients atteints de MODY (14). La plupart des mutations identifiées atteignent des acides aminés essentiels dans le clivage de l'insuline ou dans son repliement (**Figure 32**). Ainsi, ces altérations causent une mauvaise configuration de la proinsuline, entraînant un engorgement en protéines mal conformées et un stress du réticulum endoplasmique, et *in fine* une apoptose des cellules beta. Comme précédemment, de plus amples détails et informations sont étayés dans la revue incluse à la fin de la partie III. de cette introduction (14).

b) DT2 commun

Dans le DT2 commun, l'approche gène candidat fut moins fructueuse, sûrement dû à la plus grande complexité génétique de cette maladie qui dépend d'une grande composante environnementale et de variants non forcément codants. Après sélection d'un gène, suivant la même stratégie que précédemment, une étude d'association compare simplement les fréquences de chaque polymorphisme nucléotidique (SNP pour *single nucleotide polymorphisms* ; avec fréquence de l'allèle mineur [MAF] ≥ 5%) au locus du gène chez les cas et chez les sujets contrôles, et détermine si un des SNPs est significativement surreprésenté chez les personnes atteintes de DT2. Jusqu'à présent, six gènes identifiés par

cette approche ont été associés de façon convaincante au DT2 commun (c'est-à-dire dont l'association a été significativement répliquée dans plusieurs études, et plus particulièrement dans les études d'association pangénomique [cf infra ; partie III.4/]) :

- **PPARG** codant le récepteur *peroxisome proliferator-activated receptor- γ* qui constitue une cible des traitements sensibilisateurs à l'insuline, de la classe des thiazolidinediones.

- **KCNJ11** vu son implication fondamentale dans la sécrétion insulinaire.

- **GCK** codant la glucokinase qui a un rôle clef dans la détection du glucose par la cellule beta pancréatique (cf supra ; partie II.1/). Ce gène a été testé à la suite de la découverte de son implication dans la déclaration d'un MODY (cf infra ; partie III.3/).

- **WFS1** codant la wolframine qui tient un rôle essentiel dans le réticulum endoplasmique de la cellule beta, notamment dans sa réponse au stress et dans l'homéostasie de son calcium. Ce gène a été testé à la suite de la découverte de son implication dans le syndrome de Wolfram via des études familiales de liaison génétique (cf infra ; partie III.3/) : des mutations codantes récessives entraînent l'apparition de ce syndrome qui comprend plusieurs caractéristiques cliniques incluant un diabète non-autoimmunitaire survenant dès l'enfance, une déficience auditive qui aboutit généralement à une surdité de perception, des perturbations visuelles due à une atrophie optique bilatérale qui aboutit généralement à la cécité et une perte de la tonicité de la vessie due à des lésions du système nerveux central.

- **HNF1B** codant le facteur de transcription *hepatocyte nuclear factor 1- β* qui module l'expression de l'insuline. Ce gène a été testé à la suite de la découverte de son implication dans la déclaration d'un MODY (cf infra ; partie III.3/).

Il est important de noter que les SNPs fréquents situés au locus de ces gènes et trouvés associés à un risque de DT2 ont un effet très faible (*odds ratio* [OR] < 1,20 ; c'est-à-dire que les porteurs d'un allèle à risque situé dans ces gènes ont 20% de risque en plus de devenir diabétique de type 2) ; ce qui se démarque complètement des mutations impliquées dans le DT2 monogénique.

De plus amples détails concernant ces gènes sont étayés dans la revue incluse à la fin de la partie III. de cette introduction (14).

2/ Recherche de gènes soumis à l’empreinte parentale

La plupart des cas de DN transitoire sont isolés, mais dans environ un tiers des observations décrites, plusieurs membres d’une même famille sont touchés. C’est alors le père qui transmet la maladie, bien qu’il ne soit pas forcément atteint. Des isodisomies paternelles du bras long du chromosome 6 ont ainsi été identifiées chez de nombreux patients atteints de DN transitoire. Par ailleurs, il a été identifié chez certains patients des duplications partielles du bras long du chromosome 6, toujours héritées du père uniquement. Ces observations ont suggéré l’existence d’une empreinte parentale au niveau du chromosome 6. Une étude a ainsi identifié une région dans laquelle la méthylation de l’ADN entre les chromosomes 6q24 maternel et paternel était différente, sous-entendant des expressions géniques différentes à ce locus selon l’héritage (et à certaines périodes de la vie) (126). Il existe une multitude de gènes portant une empreinte dans cette région, cependant un gène semble se démarquer : ***PLAGL1*** (*pleiomorphic adenoma gene-like 1* ; autrement appelé *ZAC*) qui code un facteur de transcription suppresseur de tumeur, et régulateur du récepteur 1 du polypeptide PACAP (voir le rôle de ce polypeptide dans la partie II.2/ de l’introduction) (127).

Au total des anomalies du chromosome 6q24 ont été répertoriées chez 70% des patients atteints de DN transitoire (14).

3/ Etude de liaison génétique au sein de familles

A partir des années 1990, les généticiens se sont concentrés sur des analyses de liaison génétique, basées sur des rapports de recombinaisons génétiques et leur ségrégation dans des familles, afin d’identifier des gènes impliqués dans les formes familiales mono- et polygéniques du DT2. La recombinaison génétique ayant lieu naturellement lors d’une méiose (avec son lot de *crossing over*), permet de fragmenter le génome en blocs de recombinaison de tailles variables.

La méthode la plus répandue est de procéder à une étude d’exploration à l’échelle du génome entier en utilisant des marqueurs moléculaires hautement polymorphiques de l’ADN (comme des microsatellites -les plus fréquemment employés- ou des SNPs). Au sein d’une famille montrant un DT2 qui se transmet de génération en génération, il est possible d’établir l’occurrence génétique du DT2, en calculant une probabilité de co-ségrégation entre le phénotype et les blocs de recombinaison de tous les membres de la famille à l’échelle du génome. Pour calculer cette probabilité, les généticiens utilisent généralement un score appelé

LOD-score (pour *logarithm of odds* ou logarithme des probabilités). Le LOD-score compare la liaison observée avec la probabilité que celle-ci soit un événement aléatoire et permet donc d'obtenir une mesure de la certitude de l'observation sur une échelle logarithmique. Si une liaison est établie avec un LOD-score élevé (>3), il est alors possible de combiner les limites des blocs de recombinaison de chaque individu afin de déterminer l'étendue génétique du locus ainsi identifié et de sélectionner puis séquencer les gènes candidats du locus (**Figure 33**).

Les généticiens utilisent principalement deux modes pour conduire une analyse de liaison : le mode paramétrique et le mode non paramétrique. Le premier mode suppose que certaines informations sur le mode de transmission du trait observé sont connues. Ainsi, il est possible de diriger les résultats selon la transmission (autosomale récessive, autosomale dominante...) en ajustant des paramètres comme le taux de phénocopies ou la fréquence attendue de la mutation. Ce mode d'analyse est particulièrement adapté à l'étude de grandes familles présentant plusieurs sujets atteints par génération. A l'opposé, le mode non paramétrique ne suppose aucun mode de transmission. Ainsi, il ne souffre pas d'un possible biais si le mode de transmission supposé diffère du mode de transmission réel. Par contre, le mode non paramétrique est moins sensible que le mode paramétrique et il risque ainsi de ne pas détecter les liaisons plus faibles.

a) *Forme monogénique de DT2*

L'analyse de liaison génétique convient parfaitement à la découverte de mutations à effets forts, dans des études basées sur des familles plus ou moins petites (si possible multigénérationnelles) (124). Cette approche a permis d'identifier les deux premiers gènes de susceptibilité au MODY : *GCK* (MODY-2) et *HNF1A* (*hepatocyte nuclear factor 1- α* ; MODY-3). Les MODY-2 et MODY-3 sont les formes les plus fréquentes de MODY élucidé : entre 20 et 60% pour les deux sous-types de MODY, selon les cohortes (15). Concernant le MODY-2, plus de 150 mutations hétérozygotes dans *GCK* incluant des mutations faux-sens, non-sens et quelques changements dans la région promotrice, ont été répertoriées (15). Malgré nombre d'altérations consécutives dans le pancréas et le foie, les patients porteurs d'une mutation dans *GCK* montrent dans l'ensemble une hyperglycémie légère ou modérée qui peut être traitée par un simple régime (moins de 50% ont un diabète déclaré), et n'ont pas de complications microvasculaires (15). A l'opposé, les mutations hétérozygotes dans *HNF1A* (parties codantes et promoteur) impliquent un diabète bien plus sévère, traité fréquemment par

insulinothérapie et entraînant des complications microvasculaires (15). *HNF1A* code un facteur de transcription du gène de nombre de gènes (dont *PDX1*), codant des protéines clefs dans la sécrétion d'insuline par les cellules beta matures mais aussi dans la prolifération et l'apoptose des cellules beta (15).

A la suite de la découverte de l'implication de *HNF1A* dans la déclaration d'un MODY fréquent, les généticiens ont pris conscience de l'importance que pouvait avoir les facteurs de transcription dans la déclaration d'un MODY et ont donc testé tous les facteurs de transcription de la famille des HNF et d'autres tenant un rôle clef dans le développement et le fonctionnement de la cellule beta pancréatique. C'est par cette approche de gène candidat, consécutive aux études de liaison, qu'ont été découverts quatre nouveaux gènes de susceptibilité au MODY : *HNF4A* (*hepatocyte nuclear factor 1- α* ; MODY-1 [pour l'anecdote, il fut appelé MODY-1 car une liaison génétique avait été identifiée au locus de ce gène avant la découverte de *GCK* mais le gène n'avait pas été ciblé]), *PDX1* (*pancreatic and duodenal homeobox 1*; MODY-4), *HNF1B* (MODY-5) et *NEUROD1* (*neurogenic differentiation 1*; MODY-6). Ces quatre sous-types de MODY sont tous rares et assez sévères (15). Des mutations codantes à l'état homozygote dans les gènes *PDX1*, *GCK* et *NEUROD1* ont été identifiées chez des patients atteints de DN. Plus précisément, concernant *PDX1*, ces patients souffrent d'une agénésie du pancréas et concernant *NEUROD1*, ils montrent en plus une hypoplasie sévère du cervelet, une surdité profonde de l'oreille interne et des altérations de la vue due à une myopie sévère et une dystrophie de la rétine (15).

De plus amples détails et informations concernant cette sous-partie sont étayés dans la revue incluse à la fin de la partie III. de cette introduction (14).

b) DT2 commun

Concernant le DT2 commun, l'étude de liaison génétique a permis d'identifier un seul gène de susceptibilité au DT2 (qui a ensuite été confirmé par les études d'association pangénomique) mais non des moindres : *TCF7L2* codant le facteur de transcription *transcription factor 7-like 2*, qui joue un rôle clef dans la voie de signalisation Wnt (128). *TCF7L2* représente à ce jour le locus qui implique le plus gros effet sur le risque de survenue d'un DT2 (OR ~ 1,45).

Un paragraphe détaillé a été dédié à cette découverte et à la biologie de la protéine codée par ce gène dans la revue incluse à la fin de la partie III. de cette introduction (14).

4/ Etude d'association pangénomique cas / contrôles dans le diabète de type 2 commun

Les études d'association pangénomique (ou GWAS pour *genome-wide association studies*) utilisent des cartes denses de SNPs localisés sur l'ensemble du génome humain afin de rechercher des différences de fréquence allélique entre des cas (c'est-à-dire des patients avec une maladie particulière comme le DT2) et des contrôles. Une différence de fréquence suffisamment significative indique que la région correspondante du génome contient des variants génomiques fonctionnels qui influencent la maladie.

La logique des GWAS est : 'une maladie commune, des variants communs' ; ce qui sous-entend que les maladies communes (telles que le DT2 commun) sont dues en grande majorité à plusieurs SNPs présents chez plus de 1-5% de la population étudiée.

L'approche 'génomome entier' appliquée dans la génétique humaine date des années 80, lors de la construction de cartes de liaison du génome humain, en utilisant les marqueurs moléculaires RFLP (*restriction fragment length polymorphisms*) (129). Les premières applications (intuitives) portaient sur les maladies Mendéliennes. Cependant, les généticiens ont rapidement choisi d'utiliser aussi cette approche dans des maladies à transmission plus complexe. Il fut alors proposé de cartographier les déséquilibres de liaison (LD pour *linkage disequilibrium*), en considérant qu'une mutation partagée par des patients atteints d'une même maladie, dans une même population (c'est-à-dire ayant des ancêtres communs), est entourée d'allèles proches partagés qui incarnent l'haplotype du chromosome ancestral sur lequel la mutation est apparue en premier (129). Depuis 2003, le projet international HapMap a généré, pour plusieurs populations (originaires d'Afrique, d'Asie et d'Europe), des cartes du génome humain divisé en des milliers de groupes de SNPs fréquents ($MAF \geq 5\%$) hautement corrélés (fort LD), chaque groupe étant représenté par un SNP 'porte-drapeau' (ou *tagSNP*). La phase II du projet avait montré que la grande majorité des SNPs avec une $MAF \geq 5\%$ pouvait être réduite à ~550 000 blocs de LD représentés par un tagSNP chez les individus originaires d'Europe et d'Asie, et à ~1 100 000 blocs de LD chez les individus originaires d'Afriques ($r^2 \geq 0.8$) (**Figure 34**) (130). En génotypant tous les tagSNPs d'un échantillon d'ADN humain, il était alors possible de connaître plus de 80% des SNPs présents (avec une $MAF \geq 5\%$) à travers le génome de l'individu testé (130).

Simultanément à ce bel effort de la communauté scientifique visant à disséquer le génome humain en blocs de LD, une véritable révolution technologique a eu lieu dans le génotypage des SNPs (131). En moins de 10 ans, les avancées technologiques ont permis de passer du test d'un SNP au génotypage simultané de centaines de milliers de SNPs par

individu (plus de deux millions aujourd'hui), en utilisant des puces à ADN. Ainsi, les GWAS ont incarné un grand pas en avant par rapport aux études de liaison familiale car elles peuvent être à l'échelle de milliers d'individus issus d'une population, testés pour des centaines de milliers de SNPs à la fois. A ce jour, le Catalogue des GWAS (132) a répertorié 3 283 SNPs associés à un large spectre d'états humains, issus de 681 publications (**Figure 35**). Il est important de noter que le seuil ' $p\text{-value} \leq 5 \times 10^{-8}$ ' visible sur la Figure 35 correspond au seuil de Bonferroni. Quand une association significative est identifiée entre un SNP et la maladie testée, une $p\text{-value}$ inférieure à 0,05 (seuil habituellement utilisé en statistique) ne suffit pas. La correction de Bonferroni est une protection contre les tests multiples de significativité statistique basés sur le même échantillon de données, pouvant donner une significativité apparente et non réelle. En effet, seulement par chance, un test sur 20 peut apparaître significatif avec une $p\text{-value}$ inférieure à 0,05. La correction de Bonferroni indique que si un expérimentateur teste n hypothèses (dépendantes ou indépendantes) sur un même échantillon de données, alors la significativité statistique qui doit être utilisée pour chaque hypothèse testée est $1/n$. Concernant les GWAS, le test de plusieurs centaines de milliers de SNPs par individu explique le seuil si bas accepté aujourd'hui par la communauté des généticiens.

A ce jour, dans le DT2 commun, les GWAS et les méta-analyses de GWAS réalisées par des consortia internationaux comme DIAGRAM+ (qui permettent d'augmenter plus encore la puissance statistique en regroupant les données issues de plusieurs GWAS) ont permis d'identifier plus de 30 loci/gènes de susceptibilité au DT2 en moins de trois ans. Une partie de ces loci/gènes est détaillée dans la revue incluse à la fin de la partie III de cette introduction (14). Depuis la publication (pourtant récente) de cette revue, 11 nouveaux loci/gènes de susceptibilité au DT2 ont été rapporté par le consortium DIAGRAM+ (133) et deux autres par une étude GWAS effectuée dans une population japonaise dont un locus a été confirmé dans des populations européennes (134). Voici la liste de ces nouveaux loci/gènes de susceptibilité au DT2 :

- **BCL11A** codant la protéine doigt de Zn *B-cell CLL/lymphoma 11A*, majoritairement présente dans les muscles, le cortex et le pancréas mais de façon faible dans les îlots et les cellules beta. Aucune association avec les traits glycémiques n'a été révélée (133).
- **ZBED3** codant la protéine doigt de Zn *BED-type containing 3*, très ubiquitaire. Le SNP augmentant le risque de survenue d'un DT2, augmente aussi la glycémie à jeun (133).
- **KLF14** codant le facteur de transcription *Kruppel-like factor 14*, majoritairement présent dans le cerveau et les reins, et de façon quasi nulle dans les îlots et les cellules beta. Le SNP

augmentant le risque de survenue d'un DT2, augmente aussi l'insulinémie à jeun et l'indice d'évaluation de l'insulino-résistance à jeun (HOMA-IR) (133).

- **TP53INP1** codant la protéine tumorale *p53 inducible nuclear protein 1*, très ubiquitaire. Le SNP augmentant le risque de survenue d'un DT2, augmente aussi la glycémie à jeun (133).

- **CHCHD9** codant la protéine *coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 9* qui est très peu connue (DIAGRAM+ n'avait pas réussi à obtenir une sonde correcte de RT-PCR quantitative ainsi aucune donnée d'expression n'avait pu être rapportée dans la publication). Aucune association avec les traits glycémiques n'a été révélée (133).

- **HMGA2** codant la protéine *high mobility group AT-hook 2*, majoritairement présente dans le cerveau et de façon moindre dans le pancréas (dont les cellules beta). Aucune association avec les traits glycémiques n'a été révélée (133).

- **ARAP1** (anciennement **CENTD2**) codant la protéine ubiquitaire *ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH domain 1* associées au Golgi. Aucune association avec les traits glycémiques n'a été révélée (133).

- **ZFAND6** codant la protéine doigt de Zn *ANI-type domain 6*, surtout présente dans le cerveau et les reins, mais aussi présente dans les îlots. Aucune association avec les traits glycémiques n'a été révélée (133).

- **PRC1** codant la protéine régulatrice *protein regulator of cytokinesis 1*, majoritairement présente dans le cerveau et impliquée dans la mitose. Le SNP augmentant le risque de survenue d'un DT2, augmente aussi la glycémie à jeun et 2h après une HGPO (133).

- **DUSP9** codant la protéine kinase phosphatase *dual specificity phosphatase 9*, présente uniquement dans le cerveau, le cœur et les muscles squelettiques. Aucune association avec les traits glycémiques n'a été révélée (133).

- **HNF1A** qui avait déjà été étudié dans une approche gène candidat après la découverte de son implication dans le MODY. Mais jusqu'alors, le locus n'avait jamais été confirmé par les études d'association pangénomique. La puissance statistique résultant de la méta-analyse de DIAGRAM+ a permis d'atteindre le seuil de significativité imposé par la correction de Bonferroni (133).

- **UBE2E2** codant l'enzyme *ubiquitin-conjugating enzyme E2E2*, connue pour être présente dans le pancréas, le foie, le muscle et le tissu adipeux. A ce jour, l'association entre l'allèle mineur du SNP et l'augmentation du risque de survenue d'un DT2 n'a été révélée que dans des populations asiatiques. Dans ces populations, l'allèle mineur est aussi associé à une diminution de l'indice d'évaluation de la fonction de la cellule beta à jeun (HOMA-B ; cf infra, partie III.6/), révélant peut-être une diminution de la sécrétion insulinique (134).

- **C2CD4A-C2CD4B** codant la protéine *C2 calcium-dependent domain containing 4*, impliquée dans le contrôle de la structure cellulaire et connue pour être présente dans le pancréas, le foie, le muscle et le tissu adipeux. L'association entre l'allèle mineur du SNP et l'augmentation du risque de survenue d'un DT2 a été identifiée dans des populations asiatiques et confirmée dans des populations européennes (134).

Il est important de noter que chaque gène ici rapporté sous-entend l'association d'un seul SNP (compris dans un bloc de LD) avec le risque de survenue d'un DT2. Les généticiens rapportent le gène le plus proche du SNP. Parfois, des études d'expression eQTL (*quantitative trait loci*) basées sur l'analyse croisée du génome et du transcriptome (dans des tissus spécifiques) via des puces à ADN, permettent de savoir que le SNP régule l'expression du gène rapporté. Mais la plupart du temps, comme les SNPs associés sont situés dans des régions non-codantes et ont des effets très faibles (cf infra partie III.5/ et revue incluse à la fin de la partie III de cette introduction), il est impossible de savoir s'ils sont bel et bien corrélés au gène le plus proche et non à un gène situé plus loin sur le chromosome (voire sur un autre chromosome). La transition du signal d'association vers les mécanismes moléculaires sous-jacents et *in fine* vers de nouvelles opportunités thérapeutiques reste un véritable défi (135).

Quoiqu'il en soit, la majorité des variants/mutations identifiés jusqu'alors dont les effets fonctionnels sont connus (dans les formes de DT2 mono- et polygénique) ont un rôle crucial dans le développement et les fonctions de la cellule beta (plutôt que dans la sensibilité à l'insuline) (cf revue incluse à la fin de la partie III. de cette introduction).

5/ Le 'dark matter'

Les études GWAS (ou les méta-analyses de GWAS) cas / contrôle du DT2 ont apporté certes nombre de loci de susceptibilité à cette maladie (jamais une technique en avait révélé autant, en si peu de temps), mais comme abordé précédemment, tous les SNPs identifiés ont un très faible effet sur le risque de survenue d'un DT2 (en moyenne 15% de risque par allèle mineur, excepté *TCF7L2* avec un OR avoisinant 1,45). Tant est si bien que les 38 loci de susceptibilité au DT2 répertoriés jusqu'à aujourd'hui (**Annexe 1**) n'expliquent que 10% environ de l'héritabilité de la maladie (133). Ce qui laisse 90% de 'dark matter' ou de part d'ombre dans l'étiologie génétique du DT2.

Ce constat a été le même pour d'autres maladies polygéniques étudiées par GWAS : la maladie de Crohn (32 loci identifiés pour 80% de part d'ombre), la dégénérescence maculaire liée à l'âge (5 loci identifiés pour 50% de part d'ombre), le lupus érythémateux systémique (6

loci identifiés pour 85% de part d'ombre), l'infarctus précoce du myocarde (9 loci identifiés pour plus de 97% de part d'ombre) (131)...

Afin de diminuer cette part d'ombre, le laboratoire avait décidé au début de ma thèse de réaliser des études GWAS de traits associés au DT2 et d'essayer de découvrir par cette stratégie indirecte de nouveaux loci de susceptibilité à cette maladie. Par conséquent, nous sommes passés d'un modèle binaire cas / contrôle à un modèle linéaire, basé sur l'ensemble de la distribution d'un trait quantitatif dans une population générale. Ainsi, même si la technique était la même (basée sur des puces à ADN), l'approche analytique en a été tout autre (**Figure 36**).

6/ Etudes d'association pangénomique des traits quantitatifs associés au diabète de type 2 commun

Nous avons choisi en premier lieu de nous concentrer sur la génétique de la variabilité de la glycémie à jeun car une élévation de ce trait sert à établir le diagnostic du DT2 (cf supra ; partie I.2/). En outre, une augmentation même modeste (lors d'un état prédiabétique) est associée à des maladies cardio-vasculaires et une athérosclérose accélérée (136). Chez les individus progressant vers un DT2, la glycémie à jeun semble évoluer modestement dans la durée jusqu'à l'évènement du dysfonctionnement de la cellule beta où la glycémie augmente très rapidement (137; 138). Plusieurs études ont rapporté que le fait de diminuer la glycémie à jeun chez les patients atteints de DT2 peut retarder voire empêcher les complications associées au DT2, prouvant davantage les effets délétères des augmentations chroniques de glucose (139).

Il a été établi que la glycémie à jeun était un trait quantitatif héritable à 30% environ (139). Des études basées sur deux gènes candidats avaient déjà montré que des SNPs localisés dans *GCK* et dans *GCKR* contribuaient significativement à la variabilité de la glycémie à jeun dans des populations Européennes, avec un effet accru sur le risque de DT2 (140-142).

Au vu du rôle central de la glycémie dans la physiopathologie et le diagnostic du DT2 commun, une étude GWAS pour la glycémie à jeun tenait toutes ses promesses dans la découverte possible de nouveaux loci de susceptibilité au DT2. Nous avons utilisé les puces à ADN de 654 participants normoglycémiques issus de la cohorte générale Française D.E.S.I.R. (ayant servi comme contrôles dans l'étude GWAS du DT2 publié peu de temps auparavant (143)) et avons analysé les contributions des SNPs présents sur la puce à la variabilité de la glycémie à jeun mesurée chez les 654 participants (144). Il est important de noter que nous

avons exclu de l'étude tout sujet diabétique afin d'éviter les biais entraînés par les traitements hypoglycémisants. Nous avons identifié une association fortement significative entre l'allèle mineur du SNP rs560887 situé dans le gène *G6PC2* et une diminution de la glycémie à jeun. Cette association a été répliquée chez 8 699 participants Européens normoglycémique (méta-analyse : $N = 9\,353$; effet de l'allèle mineur $\beta_{[95\% \text{ de l'intervalle de confiance}]} = -0,06_{[-0,08; -0,05]}$ mmol/l et $P = 4 \times 10^{-23}$). De manière surprenante, aucune association entre le SNP et le risque de DT2 n'a été identifiée malgré un large génotypage effectué ($N_{\text{cas}} = 2\,972$; $N_{\text{contrôles}} = 4\,073$) (144).

G6PC2 nous semblait être un bon candidat. En effet, ce gène code une glucose-6-phosphatase spécifique des îlots pancréatiques (*G6PC2* ou IGRP pour *islet-specific glucose-6-phosphatase-related protein*). Bien que l'activité des glucose-6-phosphatases ait été montrée très faible dans les cellules beta (cf supra ; partie II.1/) et donc que le rôle exact de *G6PC2* reste obscur dans ces cellules, l'inactivation de *G6pc2* chez la souris entraîne une diminution d'environ 15% de la glycémie à jeun, sans modification de la sensibilité à l'insuline (144). Cette observation pourrait suggérer que *G6PC2* pourrait s'opposer à l'action de GCK et ainsi moduler la glycolyse au sein de la cellule beta.

Peu de temps plus tard, une autre étude GWAS pour la glycémie à jeun basée sur 5 088 individus Européens non-diabétiques a aussi révélé un SNP associé à la glycémie à jeun, situé dans le même bloc de liaison que le SNP rs560887 mais plus en aval de *G6PC2*, dans la zone promotrice du gène *ABCB11* (codant la protéine *ATP-binding cassette, subfamily B (MDR/TAP), member 11*) (139). D'après les auteurs, comme la fonction de *G6PC2* restait assez obscure, *ABCB11* pouvait aussi incarner un candidat plausible dans l'association avec la glycémie à jeun : la protéine *ABCB11* est impliquée dans la sécrétion ATP-dépendante des sels biliaires et pratiquement seulement exprimée dans le foie. Or des études pharmaceutiques avaient montré que des séquestrants de la bile pouvaient entraîner une diminution de la glycémie et améliorer la sensibilité à l'insuline (139).

Par conséquent, des études supplémentaires étaient envisageables à ce locus, à la fois d'un point de vue génétique (« affinage » de l'association par génotypage supplémentaire de SNPs en LD) puis fonctionnel (cf infra ; Présentation des travaux). Et d'autre part, ces premières études GWAS pour la glycémie à jeun étaient prometteuses et offraient des perspectives de recherche de signaux d'association avec d'autres traits associés au DT2.

Revue.

“The emerging genetics of type 2 diabetes”

(Trends in Molecular Medicine. 2010 Sep;16(9):407-16)

Bonnefond A, Froguel P, Vaxillaire M.

BUT DE LA THÈSE

Deux buts principaux se sont dessinés pendant les 3 années de ma thèse :

1/ Identifier de nouveaux loci/gènes contribuant à la variabilité des traits associés au contrôle glycémique par études GWAS, afin d'identifier de nouveaux loci à risque du DT2 passés inaperçus par études cas/contrôle, et de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie via l'étude génétique conjointe de différents traits phénotypiques liés au diabète.

2/ Réaliser l'étude fonctionnelle de variants identifiés dans des séquences promotrices de deux gènes associés à la survenue d'un diabète ou à la variabilité de la glycémie, afin de tester l'hypothèse causale dans la survenue de la maladie ou la variabilité d'un trait, et d'essayer d'approfondir les mécanismes de régulation impliqués dans l'action de ces protéines.

Ce travail a tenté d'utiliser en profondeur les potentialités des études GWAS et de la génétique épidémiologique pour mettre à jour de nouveaux gènes associés au DT2 par l'étude du contrôle génétique de la glycémie et ensuite d'explorer les possibilités de passer de l'association à la causalité par les analyses biologique et moléculaire des effets de SNPs potentiellement délétères.

PRÉSENTATION DES TRAVAUX

Mes travaux seront présentés par thème :

I. GÉNÉTIQUE DE LA GLYCÉMIE À JEUN ET DES RÉPONSES GLYCÉMIQUE ET INSULINÉMIQUE À L'HYPERGLYCÉMIE PROVOQUÉE



Article 1. “A variant near *MTNR1B* is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk” (*Nature Genetics*. 2009 Jan;41(1):89-94).

Bouatia-Naji N*, **Bonnefond A*** (*co-first authors), Cavalcanti-Proença C, Sparsø T, Holmkvist J, Marchand M, Delplanque J, Lobbens S, Rocheleau G, Durand E, De Graeve F, Chèvre JC, Borch-Johnsen K, Hartikainen AL, Ruokonen A, Tichet J, Marre M, Weill J, Heude B, Tauber M, Lemaire K, Schuit F, Elliott P, Jørgensen T, Charpentier G, Hadjadj S, Cauchi S, Vaxillaire M, Sladek R, Visvikis-Siest S, Balkau B, Lévy-Marchal C, Pattou F, Meyre D, Blakemore AI, Jarvelin MR, Walley AJ, Hansen T, Dina C, Pedersen O, Froguel P.



Article 2. “G-allele of intronic rs10830963 in *MTNR1B* confers increased risk of impaired fasting glycemia and type 2 diabetes through an impaired glucose-stimulated insulin release: studies involving 19,605 Europeans” (*Diabetes*. 2009 Jun;58(6):1450-6).

Sparsø T*, **Bonnefond A*** (*co-first authors), Andersson E, Bouatia-Naji N, Holmkvist J, Wegner L, Grarup N, Gjesing AP, Banasik K, Cavalcanti-Proença C, Marchand M, Vaxillaire M, Charpentier G, Jarvelin MR, Tichet J, Balkau B, Marre M, Lévy-Marchal C, Faerch K, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Madsbad S, Poulsen P, Vaag A, Dina C, Hansen T, Pedersen O, Froguel P.



Article 3. “New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk” (*Nature Genetics*. 2010 Feb;42(2):105-16).

Dupuis J, Langenberg C, Prokopenko I, Saxena R, Soranzo N, Jackson AU, Wheeler E, Glazer NL, Bouatia-Naji N, Gloyn AL, Lindgren CM, Mägi R, Morris AP, Randall J, Johnson T, Elliott P, Rybin D, Thorleifsson G, Steinthorsdottir V, Henneman P, Grallert H, Dehghan A, Hottenga JJ, Franklin CS, Navarro P, Song K, Goel A, Perry JR, Egan JM, Lajunen T, Grarup N, Sparsø T, Doney A, Voight BF, Stringham HM, Li M, Kanoni S, Shrader P, Cavalcanti-Proença C, Kumari M, Qi L, Timpson NJ, Gieger C, Zabena C, Rocheleau G, Ingelsson E, An P, O'Connell J, Luan J, Elliott A, McCarroll SA, Payne F, Rocaesecca RM, Pattou F, Sethupathy P, Ardlie K, Ariyurek Y, Balkau B, Barter P, Beilby JP, Ben-Shlomo Y, Benediktsson R, Bennett AJ, Bergmann S, Bochud M, Boerwinkle E, **Bonnefond A**, Bonnycastle LL, Borch-Johnsen K, Böttcher Y, Brunner E, Bumpstead SJ, Charpentier G, Chen YD, Chines P, Clarke R, Coin LJ, Cooper MN, Cornelis M, Crawford G, Crisponi L, Day IN, de Geus EJ, Delplanque J, Dina C, Erdos MR, Fedson AC, Fischer-Rosinsky A, Forouhi NG, Fox CS, Frants R, Franzosi MG, Galan P, Goodarzi MO, Graessler J, Groves CJ, Grundy S, Gwilliam R, Gyllensten U, Hadjadj S, Hallmans G, Hammond N, Han X, Hartikainen AL, Hassani N, Hayward C, Heath SC, Hercberg S, Herder C, Hicks AA, Hillman DR, Hingorani AD, Hofman A, Hui J, Hung J, Isomaa B, Johnson PR, Jørgensen T, Jula A, Kaakinen M, Kaprio J, Kesaniemi YA, Kivimäki M, Knight B, Koskinen S, Kovacs P, Kyvik KO, Lathrop GM, Lawlor DA, Le Bacquer O, Lecoeur C, Li Y, Lyssenko V, Mahley R, Mangino M, Manning AK, Martínez-Larrad MT, McAtteer JB, McCulloch LJ, McPherson R, Meisinger C, Melzer D, Meyre D, Mitchell BD, Morken MA, Mukherjee S, Naitza S, Narisu N, Neville MJ, Oostra BA, Orrù M, Pakyz R, Palmer CN, Paolisso G, Pattaro C, Pearson D, Peden JF, Pedersen NL, Perola M, Pfeiffer AF, Pichler I, Polasek O, Posthuma D, Potter SC, Pouta A, Province MA, Psaty BM, Rathmann W, Rayner NW, Rice K, Ripatti S, Rivadeneira F, Roden M, Rolandsson O, Sandbaek A, Sandhu M, Sanna S, Sayer AA, Scheet P, Scott LJ, Seedorf U, Sharp SJ, Shields B, Sigurdsson G, Sijbrands EJ, Silveira A, Simpson L, Singleton A, Smith NL, Sovio U, Swift A, Syddall H, Syvänen AC, Tanaka T, Thorand B, Tichet J, Tönjes A, Tuomi T, Uitterlinden AG, van Dijk KW, van Hoek M, Varma D, Visvikis-Siest S, Vitart V, Vogelzangs N, Waeber G, Wagner PJ, Walley A, Walters GB, Ward KL, Watkins H, Weedon MN, Wild SH, Willemsen G, Witteman JC, Yarnell JW, Zeggini E, Zelenika D, Zethelius B, Zhai G, Zhao JH, Zillikens MC; DIAGRAM Consortium; GIANT Consortium; Global BPgen Consortium; Borecki IB, Loos RJ, Meneton P, Magnusson PK, Nathan DM, Williams GH, Hattersley AT, Silander K, Salomaa V, Smith GD, Bornstein SR, Schwarz P, Spranger J, Karpe F, Shuldiner AR, Cooper C, Dedoussis GV, Serrano-Ríos M, Morris AD, Lind L, Palmer LJ, Hu FB, Franks PW, Ebrahim S, Marmot M, Kao WH, Pankow JS, Sampson MJ, Kuusisto J, Laakso M, Hansen T, Pedersen O, Pramstaller PP, Wichmann HE, Illig T, Rudan I, Wright AF, Stumvoll M, Campbell H, Wilson JF, Anders Hamsten on behalf of Procardis Consortium; MAGIC investigators, Bergman RN, Buchanan TA, Collins FS, Mohlke KL, Tuomilehto J, Valle TT, Altshuler D, Rotter JJ, Siscovick DS, Penninx BW, Boomsma DI, Deloukas P, Spector TD, Frayling TM, Ferrucci L, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K, van Duijn CM, Aulchenko YS, Cao A, Scuteri A, Schlessinger D, Uda M, Ruokonen A, Jarvelin MR, Waterworth DM, Vollenweider P, Peltonen L, Mooser V, Abecasis GR, Wareham NJ, Sladek R, Froguel P, Watanabe RM, Meigs JB, Groop L, Boehnke M, McCarthy MI, Florez JC, Barroso I.




Article 4. “Genetic variation in *GIPR* influences the glucose and insulin responses to an oral glucose challenge” (*Nature Genetics*. 2010 Feb;42(2):142-8).


Saxena R, Hivert MF, Langenberg C, Tanaka T, Pankow JS, Vollenweider P, Lyssenko V, Bouatia-Naji N, Dupuis J, Jackson AU, Kao WH, Li M, Glazer NL, Manning AK, Luan J, Stringham HM, Prokopenko I, Johnson T, Grarup N, Boesgaard TW, Lecoeur C, Shrader P, O'Connell J, Ingelsson E, Couper DJ, Rice K, Song K, Andreassen CH, Dina C, Köttgen A, Le Bacquer O, Pattou F, Taneera J, Steinthorsdottir V, Rybin D, Ardlie K, Sampson M, Qi L, van Hoek M, Weedon MN, Aulchenko YS, Voight BF, Grallert H, Balkau B, Bergman RN, Bielinski SJ, **Bonnefond A**, Bonnycastle LL,

Borch-Johnsen K, Böttcher Y, Brunner E, Buchanan TA, Bumpstead SJ, Cavalcanti-Proença C, Charpentier G, Chen YD, Chines PS, Collins FS, Cornelis M, J Crawford G, Delplanque J, Doney A, Egan JM, Erdos MR, Firmann M, Forouhi NG, Fox CS, Goodarzi MO, Graessler J, Hingorani A, Isomaa B, Jorgensen T, Kivimaki M, Kovacs P, Krohn K, Kumari M, Lauritzen T, Lévy-Marchal C, Mayor V, McAteer JB, Meyre D, Mitchell BD, Mohlke KL, Morken MA, Narisu N, Palmer CN, Pakyz R, Pascoe L, Payne F, Pearson D, Rathmann W, Sandbaek A, Sayer AA, Scott LJ, Sharp SJ, Sijbrands E, Singleton A, Siscovick DS, Smith NL, Sparso T, Swift AJ, Syddall H, Thorleifsson G, Tönjes A, Tuomi T, Tuomilehto J, Valle TT, Waeber G, Walley A, Waterworth DM, Zeggini E, Zhao JH; GIANT consortium; MAGIC investigators, Illig T, Wichmann HE, Wilson JF, van Duijn C, Hu FB, Morris AD, Frayling TM, Hattersley AT, Thorsteinsdottir U, Stefansson K, Nilsson P, Syvänen AC, Shuldiner AR, Walker M, Bornstein SR, Schwarz P, Williams GH, Nathan DM, Kuusisto J, Laakso M, Cooper C, Marmot M, Ferrucci L, Mooser V, Stumvoll M, Loos RJ, Alshuler D, Psaty BM, Rotter JI, Boerwinkle E, Hansen T, Pedersen O, Florez JC, McCarthy MI, Boehnke M, Barroso I, Sladek R, Froguel P, Meigs JB, Groop L, Wareham NJ, Watanabe RM.

II. GÉNÉTIQUE DE L'HÉMOGLOBINE GLYQUÉE


-  **Article 1.** “Genetic variant in *HK1* is associated with pro-anemic state and A1C but not other glycemetic control related traits” (*Diabetes. 2009 Nov;58(11):2687-97*).

Bonnefond A. Vaxillaire M, Labrune Y, Lecoeur C, Chèvre JC, Bouatia-Naji N, Cauchi S, Balkau B, Marre M, Tichet J, Riveline JP, Hadjadj S, Gallois Y, Czernichow S, Herberg S, Kaakinen M, Wiesner S, Charpentier G, Lévy-Marchal C, Elliott P, Jarvelin MR, Horber F, Dina C, Pedersen O, Sladek R, Meyre D, Froguel P.

-  **Article 2.** “Common variants at ten genomic loci influence hemoglobin A1C levels via glycemetic and non-glycemetic pathways” (*Diabetes. 2010 Sep; Epub ahead of print*).

Soranzo N, Sanna S, Wheeler E, Gieger C, Radke D, Dupuis J, Bouatia-Naji N, Langenberg C, Prokopenko I, Stolerman E, Sandhu MS, Heehey MM, Devaney JM, Reilly MP, Ricketts SL, Stewart AF, Voight BF, Willenborg C, Wright B, Alshuler D, Arking D, Balkau B, Barnes D, Boerwinkle E, Böhm B, **Bonnefond A.** Bonnycastle LL, Boomsma DI, Bornstein SR, Böttcher Y, Bumpstead S, Burnett-Miller MS, Campbell H, Cao A, Chambers J, Clark R, Collins FS, Coresh J, de Geus EJ, Dei M, Deloukas P, Döring A, Egan JM, Elosua R, Ferrucci L, Forouhi N, Fox CS, Franklin C, Franzosi MG, Gallina S, Goel A, Graessler J, Grallert H, Greinacher A, Hadley D, Hall A, Hamsten A; on behalf of Procardis Consortium, Hayward C, Heath S, Herder C, Homuth G, Hottenga JJ, Hunter-Merrill R, Illig T, Jackson AU, Jula A, Kleber M, Knouff CW, Kong A, Koener J, Köttgen A, Kovacs P, Krohn K, Kühnel B, Kuusisto J, Laakso M, Lathrop M, Lecoeur C, Li M, Li M, Loos RJ, Luan J, Lyssenko V, Mägi R, Magnusson PK, Mälärstig A, Mangino M, Martínez-Larrad MT, März W, McArdle WL, McPherson R, Meisinger C, Meitinger T, Melander O, Mohlke KL, Mooser VE, Morken MA, Narisu N, Nathan DM, Nauck M, O'Donnell C, Oexle K, Olla N, Pankov JS, Payne F, Peden JF, Pedersen NL, Peltonen L, Perola M, Polasek O, Porcu E, Rader DJ, Rathmann W, Ripatti S, Rocheleau G, Roden M, Rudan I, Salomaa V, Saxena R, Schlessinger D, Schunkert H, Schwarz P, Seedorf U, Selvin E, Serrano-Rios M, Shrader P, Silveira A, Siscovick D, Song K, Spector TD, Stefansson K, Steinthorsdottir V, Strachan DP, Strawbridge R, Stumvoll M, Surakka I, Swift AJ, Tanaka T, Teumer A, Thorleifsson G, Thorsteinsdottir U, Tönjes A, Usala G, Vitart V, Völzke H, Wallaschofski H, Waterworth DM, Watkins H, Wichmann HE, Wild SH, Willemsen G, Williams GH, Wilson JF, Winkelmann J, Wright AF; WTCCC, Zabena C, Zhao JH, Epstein SE, Erdmann J, Hakonarson HH, Kathiresan S, Khaw KT, Roberts R, Samani NJ, Fleming MD, Sladek R, Abecasis G, Boehnke M, Froguel P, Groop L, McCarthy MI, Kao WH, Florez JC, Uda M, Wareham NJ, Barroso I, Meigs JB.

III. ÉTUDES FONCTIONNELLES DE VARIANTS GÉNÉTIQUES ASSOCIÉS À LA GLYCÉMIE






-  **Article 1.** “Genetic and functional assessment of the role of the rs13431652-A and rs573225-A alleles in the *G6PC2* promoter that strongly associate with elevated fasting glucose levels” (*Diabetes. 2010 Oct;59(10):2662-71*).

Bouatia-Naji N*, **Bonnefond A*** (*co-first authors), Baerenwald DA, Marchand M, Bugliani M, Marchetti P, Pattou F, Printz RL, Flemming BP, Umunakwe OC, Conley NL, Vaxillaire M, Lantieri O, Balkau B, Marre M, Lévy-Marchal C, Elliott P, Jarvelin MR, Meyre D, Dina C, Oeser JK, Froguel P, O'Brien RM.

-  **Article 2.** “Alteration of KLF11-regulated insulin biosynthesis in neonatal diabetes mellitus” (*submitted to J Clin Invest – under external review*).

Bonnefond A*, Lomber G* (*co-first authors), Buttar N, Busiah K, Vaillant E, Lobbens S, Yengo L, Mignot B, Simon A, Scharfmann R, Neve B, Tanyolac S, Hodoglugil U, Pattou F, Cavé H, Iovanna J, Stein R, Polak M, Vaxillaire M, Froguel P, Urrutia R.

Autres publications (hors revues) portant sur des travaux réalisés pendant ma thèse et auxquels j'ai contribué :

-  “Molecular Diagnosis of Neonatal Diabetes Mellitus using Next-Generation Sequencing of the Whole Exome” (*PLoS ONE*. 2010 Oct).
Bonnefond A, Durand E, Sand O, De Graeve F, Gallina S, Busiah K, Lobbens S, Simon A, Bellanné-Chantelot C, Létourneau L, Scharfmann R, Delplanque J, Sladek R, Polak M, Vaxillaire M, Froguel P.
-  “*MTNR1B* G24E variant associates with BMI and fasting plasma glucose in the general population in studies of 22,142 Europeans” (*Diabetes*. 2010 Jun;59(6):1539-48).
Andersson EA, Holst B, Sparsø T, Grarup N, Banasik K, Holmkvist J, Jørgensen T, Borch-Johnsen K, Egerod KL, Lauritzen T, Sørensen TI, **Bonnefond A**, Meyre D, Froguel P, Schwartz TW, Pedersen O, Hansen T.
-  “Insulin gene mutations resulting in early-onset diabetes: marked differences in clinical presentation, metabolic status, and pathogenic effect through endoplasmic reticulum retention” (*Diabetes*. 2010 Mar;59(3):653-61).
Meur G, Simon A, Harun N, Virally M, Dechaume A, **Bonnefond A**, Fetita S, Tarasov AI, Guillausseau PJ, Boesgaard TW, Pedersen O, Hansen T, Polak M, Gautier JF, Froguel P, Rutter GA, Vaxillaire M.
-  “Mutations in *G6PC2* do not contribute to monogenic forms of early infancy diabetes and beta cell dysfunction” (*Diabetologia*. 2009 May;52(5):982-5)
Bonnefond A, Bouatia-Naji N, Simon A, Saint-Martin C, Dechaume A, de Lonlay P, Polak M, Bellanné-Chantelot C, Froguel P, Vaxillaire M.
-  “Neonatal diabetes mellitus because of pancreatic agenesis with dysmorphic features and recurrent bacterial infections” (*Pediatric Diabetes*. 2008 Jun;9(3 Pt 1):240-4)
Taha D, Bardise J, Hegab A, **Bonnefond A**, Marchand M, Drunat S, Vaxillaire M, Polak M.

**I. GÉNÉTIQUE DE LA GLYCÉMIE À JEUN ET DES RÉPONSES GLYCÉMIQUE
ET INSULINÉMIQUE À L'HYPERGLYCÉMIE PROVOQUÉE**

Article 1.

“A variant near *MTNR1B* is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk”

(Nature Genetics. 2009 Jan;41(1):89-94)

Bouatia-Naji N*, **Bonnefond A*** (*co-first authors), Cavalcanti-Proença C, Sparsø T, Holmkvist J, Marchand M, Delplanque J, Lobbens S, Rocheleau G, Durand E, De Graeve F, Chèvre JC, Borch-Johnsen K, Hartikainen AL, Ruukonen A, Tichet J, Marre M, Weill J, Heude B, Tauber M, Lemaire K, Schuit F, Elliott P, Jørgensen T, Charpentier G, Hadjadj S, Cauchi S, Vaxillaire M, Sladek R, Visvikis-Siest S, Balkau B, Lévy-Marchal C, Pattou F, Meyre D, Blakemore AI, Jarvelin MR, Walley AJ, Hansen T, Dina C, Pedersen O, Froguel P.

Article 2.

“G-allele of intronic rs10830963 in *MTNR1B* confers increased risk of impaired fasting glycemia and type 2 diabetes through an impaired glucose-stimulated insulin release: studies involving 19,605 Europeans”

(Diabetes. 2009 Jun;58(6):1450-6)

Sparsø T*, **Bonnefond A*** (*co-first authors), Andersson E, Bouatia-Naji N, Holmkvist J, Wegner L, Grarup N, Gjesing AP, Banasik K, Cavalcanti-Proença C, Marchand M, Vaxillaire M, Charpentier G, Jarvelin MR, Tichet J, Balkau B, Marre M, Lévy-Marchal C, Faerch K, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Madsbad S, Poulsen P, Vaag A, Dina C, Hansen T, Pedersen O, Froguel P.

Article 3.

“New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk”

(Nature Genetics. 2010 Feb;42(2):105-16)

Dupuis J, Langenberg C, Prokopenko I, Saxena R, Soranzo N, Jackson AU, Wheeler E, Glazer NL, Bouatia-Naji N, Gloyn AL, Lindgren CM, Mägi R, Morris AP, Randall J, Johnson T, Elliott P, Rybin D, Thorleifsson G, Steinthorsdottir V, Henneman P, Grallert H, Dehghan A, Hottenga JJ, Franklin CS, Navarro P, Song K, Goel A, Perry JR, Egan JM, Lajunen T, Grarup N, Sparsø T, Doney A, Voight BF, Stringham HM, Li M, Kanoni S, Shrader P, Cavalcanti-Proença C, Kumari M, Qi L, Timpson NJ, Gieger C, Zabena C, Rocheleau G, Ingelsson E, An P, O'Connell J, Luan J, Elliott A, McCarroll SA, Payne F, Roccascaccia RM, Pattou F, Sethupathy P, Ardlie K, Ariyurek Y, Balkau B, Barter P, Beilby JP, Ben-Shlomo Y, Benediktsson R, Bennett AJ, Bergmann S, Bochud M, Boerwinkle E, **Bonnefond A**, Bonnycastle LL, Borch-Johnsen K, Böttcher Y, Brunner E, Bumpstead SJ, Charpentier G, Chen YD, Chines P, Clarke R, Coin LJ, Cooper MN, Cornelis M, Crawford G, Crisponi L, Day IN, de Geus EJ, Delplanque J, Dina C, Erdos MR, Fedson AC, Fischer-Rosinsky A, Forouhi NG, Fox CS, Frants R, Franzosi MG, Galan P, Goodarzi MO, Graessler J, Groves CJ, Grundy S, Gwilliam R, Gyllenstein U, Hadjadj S, Hallmans G, Hammond N, Han X, Hartikainen AL, Hassanali N, Hayward C, Heath SC, Hercberg S, Herder C, Hicks AA, Hillman DR, Hingorani AD, Hofman A, Hui J, Hung J, Isomaa B, Johnson PR, Jørgensen T, Jula A, Kaakinen M, Kaprio J, Kesaniemi YA, Kivimaki M, Knight B, Koskinen S, Kovacs P, Kyvik KO, Lathrop GM, Lawlor DA, Le Bacquer O, Lecoeur C, Li Y, Lyssenko V, Mahley R, Mangino M, Manning AK, Martinez-Larrad MT, McAteer JB, McCulloch LJ, McPherson R, Meisinger C, Melzer D, Meyre D, Mitchell BD, Morken MA, Mukherjee S, Naitza S, Narisu N, Neville MJ, Oostra BA, Orrù M, Pakyz R, Palmer CN, Paolisso G, Pattaro C, Pearson D, Peden JF, Pedersen NL, Perola M, Pfeiffer AF, Pichler I, Polasek O, Posthuma D, Potter SC, Pouta A, Province MA, Psaty BM, Rathmann W, Rayner NW, Rice K, Ripatti S, Rivadeneira F, Roden M, Rolandsson O, Sandbaek A, Sandhu M, Sanna S, Sayer AA, Scheet P, Scott LJ, Seedorf U, Sharp SJ, Shields B, Sigurethsson G, Sijbrands EJ, Silveira A, Simpson L, Singleton A, Smith NL, Sovio U, Swift A, Syddall H, Syvänen AC, Tanaka T, Thorand B, Tichet J, Tönjes A, Tuomi T, Uitterlinden AG, van Dijk KW, van Hoek M, Varma D, Visvikis-Siest S, Vitart V, Vogelzangs N, Waeber G, Wagner PJ, Walley A, Walters GB, Ward KL, Watkins H, Weedon MN, Wild SH, Willemsen G, Wittteman JC, Yarnell JW, Zeggini E, Zelenika D, Zethelius B, Zhai G, Zhao JH, Zillikens MC; DIAGRAM Consortium; GIANT Consortium; Global BPgen Consortium, Borecki IB, Loos RJ, Meneton P, Magnusson PK, Nathan DM, Williams GH, Hattersley AT, Silander K, Salomaa V, Smith GD, Bornstein SR, Schwarz P, Spranger J, Karpe F, Shuldiner AR, Cooper C, Dedoussis GV, Serrano-Ríos M, Morris AD, Lind L, Palmer LJ, Hu FB, Franks PW, Ebrahim S, Marmot M, Kao WH, Pankow JS, Sampson MJ, Kuusisto J, Laakso M, Hansen T, Pedersen O, Pramstaller PP, Wichmann HE, Illig T, Rudan I, Wright AF, Stumvoll M, Campbell H, Wilson JF; Anders Hamsten on behalf of Procardis Consortium; MAGIC investigators, Bergman RN, Buchanan TA, Collins FS, Mohlke KL, Tuomilehto J, Valle TT, Altshuler D, Rotter JI, Siscovick DS, Penninx BW, Boomsma DI, Deloukas P, Spector TD, Frayling TM, Ferrucci L, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K, van Duijn CM, Aulchenko YS, Cao A, Scuteri A, Schlessinger D, Uda M, Ruokonen A, Jarvelin MR, Waterworth DM, Vollenweider P, Peltonen L, Mooser V, Abecasis GR, Wareham NJ, Sladek R, Froguel P, Watanabe RM, Meigs JB, Groop L, Boehnke M, McCarthy MI, Florez JC, Barroso I.

Article 4.

“Genetic variation in *GIPR* influences the glucose and insulin responses to an oral glucose challenge”

(Nature Genetics. 2010 Feb;42(2):142-8)

Saxena R, Hivert MF, Langenberg C, Tanaka T, Pankow JS, Vollenweider P, Lyssenko V, Bouatia-Naji N, Dupuis J, Jackson AU, Kao WH, Li M, Glazer NL, Manning AK, Luan J, Stringham HM, Prokopenko I, Johnson T, Grarup N, Boesgaard TW, Lecoeur C, Shrader P, O'Connell J, Ingelsson E, Couper DJ, Rice K, Song K, Andreasen CH, Dina C, Köttgen A, Le Bacquer O, Pattou F, Taneera J, Steinhorsdottir V, Rybin D, Ardlie K, Sampson M, Qi L, van Hoek M, Weedon MN, Aulchenko YS, Voight BF, Grallert H, Balkau B, Bergman RN, Bielinski SJ, **Bonnefond A**, Bonnycastle LL, Borch-Johnsen K, Böttcher Y, Brunner E, Buchanan TA, Bumpstead SJ, Cavalcanti-Proença C, Charpentier G, Chen YD, Chines PS, Collins FS, Cornelis M, Crawford G, Delplanque J, Doney A, Egan JM, Erdos MR, Firmann M, Forouhi NG, Fox CS, Goodarzi MO, Graessler J, Hingorani A, Isomaa B, Jørgensen T, Kivimaki M, Kovacs P, Krohn K, Kumari M, Lauritzen T, Lévy-Marchal C, Mayor V, McAteer JB, Meyre D, Mitchell BD, Mohlke KL, Morken MA, Narisu N, Palmer CN, Pakyz R, Pascoe L, Payne F, Pearson D, Rathmann W, Sandbaek A, Sayer AA, Scott LJ, Sharp SJ, Sijbrands E, Singleton A, Siscovick DS, Smith NL, Sparsø T, Swift AJ, Syddall H, Thorleifsson G, Tönjes A, Tuomi T, Tuomilehto J, Valle TT, Waeber G, Walley A, Waterworth DM, Zeggini E, Zhao JH; GIANT consortium; MAGIC investigators, Illig T, Wichmann HE, Wilson JF, van Duijn C, Hu FB, Morris AD, Frayling TM, Hattersley AT, Thorsteinsdottir U, Stefansson K, Nilsson P, Syvänen AC, Shuldiner AR, Walker M, Bornstein SR, Schwarz P, Williams GH, Nathan DM, Kuusisto J, Laakso M, Cooper C, Marmot M, Ferrucci L, Mooser V, Stumvoll M, Loos RJ, Altshuler D, Psaty BM, Rotter JI, Boerwinkle E, Hansen T, Pedersen O, Florez JC, McCarthy MI, Boehnke M, Barroso I, Sladek R, Froguel P, Meigs JB, Groop L, Wareham NJ, Watanabe RM.

1/ La génétique de la glycémie à jeun et son impact sur les risques de DT2 commun

a) Le gène *MTNR1B*

Comme je l'ai abordé dans l'introduction (cf partie III.6/), l'association entre le locus *G6PC2* et la glycémie à jeun fut découverte dans notre laboratoire à partir d'une étude GWAS basée sur un assez 'faible' effectif de sujets (654 participants normoglycémiques issus de la cohorte de population générale Française D.E.S.I.R.) qui n'avait montré qu'un seul signal d'association significatif (144). C'est pourquoi nous avons cherché dans l'article 1 à identifier d'autres loci associés à la variance de la glycémie à jeun (et nous l'espérons à un risque accru de survenue d'un DT2) en augmentant la puissance de notre étude GWAS, par extension de l'effectif des participants. En plus des normoglycémiques, nous avons introduit dans l'étude des hyperglycémiques à jeun non traités. Ainsi, nous avons étudié la glycémie à jeun de sujets 'non-diabétiques' (mais pas strictement 'normoglycémiques'). Par ailleurs, nous avons augmenté l'effectif des sujets à analyser en utilisant les puces à ADN des participants non-diabétiques à l'étude GWAS cas / contrôle de l'obésité adulte et celle de l'enfant (145). Au final, nous avons donc analysé par GWAS la glycémie à jeun de sujets d'âge et d'IMC assez hétérogènes :

- 715 adultes non-diabétiques et minces, issus de la cohorte D.E.S.I.R.
- 614 enfants non-diabétiques et minces, issus de la cohorte STANISLAS et de l'étude Fleurbaix-Laventie Ville Santé II
- 247 adultes obèses non-diabétiques, recrutés par l'unité CNRS UMR8199 (Lille) et l'Hôtel-Dieu de Paris
- 575 enfants obèses non-diabétiques, recrutés par l'unité CNRS UMR8199 (Lille) et le CHU de Toulouse (Hôpital des Enfants).

La disparité apparente au niveau de l'âge et de l'IMC fut prise en compte dans l'équation de régression linéaire (en plus du sexe).

Cette étude GWAS a permis de révéler trois signaux significatifs d'association avec la glycémie à jeun, en prenant en compte le seuil de Bonferroni : le SNP rs560887 situé au locus du gène *G6PC2* d'ores et déjà rapporté ($P = 4,1 \times 10^{-7}$), le SNP rs4240702 situé au locus du gène *COL5A1* ($P = 8,0 \times 10^{-9}$) et le SNP rs1387153 situé en amont du gène *MTNR1B* ($P = 1,3 \times 10^{-7}$). De façon surprenante, une première analyse de réplification par sondes TaqMan des deux nouveaux signaux dans le reste de la population non-diabétique de la cohorte D.E.S.I.R. n'a pas confirmé l'association du SNP rs4240702 avec la glycémie à jeun. Cela montre que

malgré une p-value très basse et bien en deçà du seuil de Bonferroni, il est nécessaire de confirmer par génotypage supplémentaire des signaux significatifs issus de GWAS, dans d'autres populations (Européennes ici). Par contre, l'association de l'allèle mineur du SNP rs1387153 ($MAF_{\text{Européenne}} \sim 30\%$) avec une augmentation de la glycémie à jeun a bien été confirmée non seulement dans D.E.S.I.R. mais aussi dans trois autres populations générales Danoise, Finlandaise et Française : Inter99, NFBC86 et Hagenau, respectivement (méta-analyse globale incluant l'étude GWAS initiale : $N = 18\,254$; $\beta = 0,07_{[0,05;0,08]}$ mmol/l et $P = 2,0 \times 10^{-36}$). Contrairement au SNP rs560887 situé au locus du gène *G6PC2*, l'allèle mineur du SNP rs1387153 situé en amont du gène *MTNR1B* augmentant la glycémie à jeun était en outre associé à une augmentation du risque de DT2 dans deux analyses cas / contrôles issus de populations française et danoise (méta-analyse : $N_{\text{total}} = 15\,464$; $OR = 1,15_{[1,08;1,22]}$ et $P = 6,3 \times 10^{-5}$). Par ailleurs, les analyses basées sur les données prospectives de la cohorte D.E.S.I.R. ont montré que l'allèle mineur augmentait de 20% le risque de développer une hyperglycémie à jeun sur neuf ans de suivi ($P = 0,005$). Ainsi donc la réanalyse de nos études GWAS DT2 et obésité nous a permis, comme nous l'avions suggéré, d'identifier un nouveau gène de prédisposition au DT2, et par là même une nouvelle voie de signalisation potentiellement importante pour l'homéostasie glucidique.

Dans l'étude rapportée dans l'article 2, nous avons dans un premier temps cherché à affiner le signal d'association au locus du gène *MTNR1B* afin de savoir si le tagSNP rs1387153 « portait » réellement le signal du bloc de recombinaison : une imputation avait certes été réalisée, c'est-à-dire une prédiction d'association *in silico* de tous les SNPs répertoriés dans HapMap à partir de l'association réelle observée entre les tagSNPs et la glycémie à jeun, cependant cette analyse restait par définition du domaine de la modélisation et non de la réalité. Nous avons donc génotypé par sondes TaqMan sept SNPs fréquents en fort LD avec le SNP rs1387153 ($r^2 > 0.70$) chez plus de 11 000 individus Européens issus de populations générales (D.E.S.I.R., Hagenau et NFBC86) et dans une large étude cas / contrôle du DT2 ($N_{\text{total}} = 6\,965$). Nous avons trouvé que le SNP rs10830963 situé au milieu de l'unique intron de *MTNR1B* montrait l'effet le plus fort sur la glycémie à jeun et le risque de DT2. En outre, l'ajout du génotype du SNP rs10830963 dans l'équation de régression linéaire évaluant l'effet de chaque SNP génotypé sur la glycémie à jeun annulait totalement la contribution de chaque SNP testé à la variation de ce trait ($P > 0.12$) ; inversement, l'ajout de chaque SNP génotypé dans la régression testant l'effet du SNP rs10830963 sur la glycémie à jeun ne perturbait pas sa contribution à la variation de ce trait. Ainsi, le SNP intronique rs10830963 a un rôle indispensable dans l'association du bloc de recombinaison avec la

glycémie à jeun (et le risque de DT2). Ce résultat montre que l'imputation réalisée dans l'article 1 pointait faussement le SNP rs1387153 comme ayant l'effet le plus fort et le plus significatif sur la glycémie à jeun ; ce qui démontre que, malgré un budget certain à fournir, un « affinage » des résultats de GWAS par le génotypage de plusieurs SNPs en fort LD est utile pour confirmer les modélisations d'association *in silico* à partir des blocs de recombinaison HapMap et afin de pointer le SNP réellement porteur de l'association. Ainsi le SNP rs10830963 porte l'association ce qui peut suggérer la présence de séquences régulatrices introniques à ce locus du gène *MTNR1B*, bien que cela ne prouve pas que ce SNP soit forcément causatif pour autant.

Dans un second temps, nous avons testé l'association du SNP rs10830963 avec un large spectre de traits métaboliques dans une population générale Danoise, l'étude Inter99 (dont chaque participant a subi une HGPO), chez des participants Danois atteints de DT2 recrutés au centre *Steno Diabetes Center*, chez de jeunes participants Danois non-diabétiques (qui ont subi un test d'hyperglycémie provoquée par voie intraveineuse [HGPIV]) recrutés au centre *Research Centre for Prevention and Health* et chez des jumeaux de tout âge (qui ont subi un test HGPIV suivi d'un clamp euglycémique hyperinsulinémique) issus de la population *Danish Twin Register* ; le principal but ayant été de savoir si l'impact du SNP rs10830963 sur le DT2 (et la glycémie à jeun) était dû à un effet sur la sécrétion insulinaire ou sur la sensibilité à l'insuline. A partir de la cohorte Inter99, il est apparu que l'allèle à risque du SNP rs10830963 était associé à une augmentation de la glycémie ($N = 5\ 553$; $\beta = 0,2_{[0,1;0,2]}$ mmol/l et $P = 2 \times 10^{-7}$) et une diminution de l'insulinémie ($N = 5\ 553$; $\beta = -2,4_{[-4,5;-0,3]}$ pmol/l et $P = 0,025$) 30 minutes après une prise orale de glucose, et à une diminution de la sécrétion d'insuline évaluée à la fois par l'indice insulino-génique ($P = 1,6 \times 10^{-3}$) et par l'indice BIGTT de la réponse aïgue insulinaire au glucose ($P = 4,3 \times 10^{-12}$). Ce résultat fut confirmé chez les jeunes participants non-diabétiques ayant suivi un test HGPIV ($N = 372$) : l'allèle à risque du SNP rs10830963 était associé à un défaut de la réponse aïgue insulinaire au glucose (entre 0 et 8 minutes après injection ; $P = 2,2 \times 10^{-3}$). Après injection intraveineuse de tolbutamide qui bloque les canaux K^+ -ATP et qui stimule donc directement une sécrétion insulinaire chez les mêmes jeunes participants, le SNP rs10830963 n'avait plus aucun effet sur la sécrétion de l'hormone. Ce résultat serait en faveur d'un effet du variant en amont des canaux K^+ -ATP dans la cellule beta. Que ce soit dans l'Inter99 ou chez ces jeunes participants, aucune association entre le SNP rs10830963 et les mesures ou indices de l'insulino-résistance n'a été révélée significative. Chez les participants ayant subi une HGPIV suivi d'un clamp euglycémique hyperinsulinémique ($N = 77$), l'allèle à risque du SNP

rs10830963 n'était pas non plus associé aux mesures de sensibilité insulinaire dérivées du clamp. Cependant il était associé de façon nominale à une insulino-résistance hépatique ($P = 0.021$). Ce dernier résultat reste à être confirmé car le seuil de Bonferroni n'était pas atteint et le test portait sur un faible effectif.

Par ailleurs, ce travail a montré que l'allèle mineur du SNP rs10830963 à risque de DT2 augmentait aussi le risque d'hyperglycémie à jeun ($N = 485$; OR = $1,64_{[1,41;1,89]}$ et $P = 5,5 \times 10^{-11}$) mais pas d'intolérance au glucose ($N = 464$; OR = $0,85_{[0,72;1,00]}$ et $P = 0,051$). L'effet du SNP sur l'augmentation du risque d'hyperglycémie à jeun est remarquablement élevé (64% par allèle) pour une étude dite 'polygénique' appliquée dans le déterminisme du DT2 commun, ce qui confirme l'ampleur de la variation de glycémie liée à ce locus.

En conclusion, l'article 2 démontre que l'allèle mineur du SNP rs10830963 élevant le risque de DT2 contribue à diminuer la sécrétion insulinaire via un effet délétère (direct ou indirect) sur la cellule beta pancréatique. C'est un très bon exemple de la puissance d'investigation physiologique des études de génétique épidémiologique s'appuyant sur des cohortes très bien phénotypées de manière complémentaire.

Le gène *MTNR1B* code le récepteur 2 de la mélatonine (MT2) qui appartient à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). La mélatonine est une neurohormone circulante (dérivée de l'acide aminé tryptophane) principalement sécrétée par la glande pinéale pendant la nuit, et qui est impliquée dans la régulation du sommeil et des rythmes circadiens et saisonniers (**Figure 37**). Nombre d'études épidémiologiques ont révélé un lien entre travail de nuit et risque de maladies métaboliques incluant le DT2 (146; 147). Récemment, une étude a montré qu'un mauvais alignement entre les cycles du comportement (jeûne/repas et veille/sommeil) et les cycles circadiens endogènes augmentait de manière significative la glycémie à jeun, et ce en moins de 10 jours d'investigation (148). Trois des huit sujets étudiés ont même montré un état pré-diabétique (après HGPO). Par ailleurs, une méta-analyse a montré que la quantité et la qualité de sommeil prédisaient le risque de survenue d'un DT2 (149). Des études *in vivo* et *in vitro* suggèrent que la mélatonine est impliquée dans la régulation de l'homéostasie glucidique (150). Il a été ainsi montré qu'une pinéalectomie induisait chez le rat une augmentation de la glycémie couplée à une baisse de la concentration plasmatique d'insuline (151; 152). Chez l'homme, il a été rapporté que des patients atteints de DT2 avaient une diminution de la concentration en mélatonine circulante pendant la nuit, ainsi qu'une diminution de l'activité de l'enzyme arylalkylamine-N-acetyltransferase (AANAT), essentielle à la synthèse de la mélatonine dans la glande pinéale (153). Certaines études ont révélé que la mélatonine pouvait agir sur les cellules beta en

modulant leur activité de sécrétion insulinaire, mais les mécanismes moléculaires sous-jacents restent encore flous à ce jour (154). La mélatonine peut franchir seule la membrane plasmique des cellules ou via ses deux récepteurs MT1 (codé par *MTNR1A*) et/ou MT2 (codé par *MTNR1B*) (155). *MTNR1B* est principalement exprimé dans les noyaux suprachiasmatiques, véritable pacemaker du rythme circadien et dans la rétine (156). En outre, nous avons montré dans l'article 1 que *MTNR1B* était aussi exprimé dans des échantillons humains d'îlots de Langerhans et de cellules beta pancréatiques triées par cytométrie de flux. Ainsi, nous pourrions imaginer un effet direct du SNP rs10830963 sur la fonction du récepteur MT2 au niveau de la cellule beta.

Notre article 1 est paru dans le même numéro du journal *Nature Genetics* que deux autres études révélant la même association de *MTNR1B* avec les augmentations de la glycémie à jeun et du risque de DT2 (157; 158). La première étude par Prokopenko et al. était une méta-analyse de GWAS de la glycémie à jeun (réalisée par le pré-consortium MAGIC [*Meta-Analysis of Glucose and Insulin-related traits Consortium*]) regroupant 36 610 individus, et avait directement identifié la contribution fortement significative du SNP rs10830963 à l'augmentation de la glycémie à jeun et du risque de DT2 (avec des p-values plus basses que notre étude, vu l'effectif 30 fois plus important, mais avec le même effet de l'allèle mineur à la fois sur la glycémie à jeun et sur le risque de DT2). Ce résultat laisserait penser que l'imputation *in silico* est plus performante lorsque la puissance de l'étude est plus élevée. Cependant, il est à noter que certaines des puces ADN ici utilisées étaient des puces Affymetrix qui contenaient d'ores et déjà le SNP rs10830963, ce qui n'était pas le cas des puces Illumina (que nous avons utilisées dans notre étude GWAS). L'autre étude par Lyssenko et al. montrait que l'allèle à risque du SNP rs10830963 était associé à une détérioration de la sécrétion insulinaire par les cellules beta (ce que nous avons confirmé dans l'article 2 en utilisant d'autres cohortes, et davantage de traits métaboliques) (158). Cependant, la partie 'fonctionnelle' de l'article de Lyssenko et al. montrait les limites d'une analyse de biologie cellulaire « rapide », quelque peu opportuniste à mon avis :

i/ Ils ont montré par immunofluorescence un marquage de la protéine MT2 à la surface d'îlots de Langerhans humains et issus de rat et de souris. Or aucun anticorps anti-MT2 n'a été montré spécifique à ce jour. Ainsi, l'expérience ne peut être conclusive à elle seule.

ii/ Ils ont conclu que l'allèle à risque du SNP rs10830963 était associé à une augmentation de l'expression de *MTNR1B* (dans des îlots de Langerhans humains de qualité très variable ; nous avons accès au laboratoire à cette même collection italienne d'ARN). Or, pour arriver à cette conclusion, ils n'ont gardé que les personnes âgées de plus de 45 ans ($N = 25$; en

prenant tous les individus, aucune association significative n'était révélée), et de façon plus importante encore, ils n'ont fait aucun ajustement au sexe, ni à l'IMC. Par ailleurs, *MTNR1B* code un récepteur membranaire. Ainsi, une augmentation de la traduction ne rime pas forcément avec une augmentation du nombre de récepteurs à la surface.

iii/ Ils ont montré que la mélatonine inhibait significativement la sécrétion insulinaire des lignées murines de cellules beta INS-1 832/13 à une forte concentration de glucose (16.7 mmol/l). Ils disent aussi retrouver cet effet inhibiteur à faible concentration de glucose mais aucun graphe ni aucune valeur de p-value n'est donnée. La mélatonine peut traverser « seule » la membrane plasmique et son action ne dépend pas forcément de ses récepteurs. Ainsi, cette expérience n'est une fois de plus pas conclusive pour le rôle des récepteurs dans la sécrétion insulinaire.

Par conséquent, leur conclusion implicite de l'intérêt d'antagonistes de MT2 dans le DT2 me semble loin d'être établie et demanderait des travaux fonctionnels bien plus rigoureux.

Quant à moi, j'ai choisi de séquencer les parties codantes de *MTNR1B* dans un large échantillon d'individus diabétiques et non-diabétiques ($N_{total} \sim 7\,000$ individus) afin d'identifier des mutations rares non-synonymes et de comparer la distribution des mutations au regard des phénotypes, d'évaluer l'effet fonctionnel (inhibiteur ou activateur) de chaque mutation à l'échelle cellulaire, d'étudier les variants ayant le plus d'effet sur la fonction de MT2 à l'échelle épidémiologique et d'établir leur contribution à la variation de la glycémie à jeun et au risque de DT2. Nous avons identifié un total de 40 mutations non-synonymes réparties tout au long de la protéine (**Figure 38**) et dont la grande majorité avait une MAF inférieure à 0,001. L'étude fonctionnelle de chaque mutation est aujourd'hui terminée et il apparaît que les mutations les plus délétères ont été majoritairement retrouvées chez des patients pré-diabétiques ou atteints de DT2. L'étude épidémiologique est en phase terminale et pourra apporter (ou non) la confirmation de cette observation. Dans le cas échéant, cela montrerait que, contrairement aux conclusions de Lyssenko et al., c'est bien une dysfonction de MT2 (et non l'inverse) qui pourrait entraîner un risque accru de DT2.

b) MAGIC et la découverte de neuf nouveaux loci associés à la glycémie à jeun (article 3)

A partir de l'année 2009, nous avons (enfin) rejoint le consortium MAGIC qui s'est donné la tâche de réaliser une méta-analyse globale de toutes les études GWAS de glycémie et d'insulinémie à jeun, réalisées à ce jour sur des populations Européennes. L'objectif était d'utiliser cette puissance statistique optimale pour avoir une liste exhaustive des loci associés

à ces traits. La méta-analyse de 21 GWAS ($N_{total} = 46\ 186$ participants non-diabétiques), suivie d'une réplification des 25 premiers hits d'association chez 76 558 participants supplémentaires, ont permis d'identifier 16 loci associés à la glycémie à jeun et l'HOMA-B et deux loci associés à l'insulinémie à jeun et à l'HOMA-IR. Parmi les 16 loci associés à la glycémie à jeun et l'HOMA-B, neuf étaient nouvellement associés : *ADCY5*, *MADD*, *ADRA2A*, *CRY2*, *FADS1*, *GLIS3*, *SLC2A2*, *PROX1* et *C2CD4B*. Parmi les deux loci associés à l'insulinémie à jeun et à l'HOMA-IR, un était nouvellement associé : *IGF1*. Les fonctions des protéines codées par tous ces gènes sont amplement détaillées dans la 'box 1' de l'article 3. Brièvement, l'ensemble des protéines codées par ces gènes, ajoutés à ceux d'ores et déjà répertoriés dans la littérature, représente un large panel de fonctions biologiques : la transduction des signaux (*DGKB-TMEM195*, *ADCY5*, *FADS1*, *ADRA2A*, *SLC2A2*, *GCK*, *GCKR*, *G6PC2*, *TCF7L2*, *SLC30A8* et *IGF1*), le cycle cellulaire des cellules et leur développement (*TCF7L2*, *GLIS3*, *MADD* et *PROX1*), le transport et la détection du glucose (*SLC2A2*, *GCK*, *GCKR* et *G6PC2*) et la régulation du rythme circadien (*MTNR1B* et *CRY2*). La fonction de la protéine codée par *C2CD4B* reste complètement inconnue à ce jour mais serait présente dans les cellules beta pancréatiques humaines.

Par ailleurs, de façon assez surprenante, seulement sept des 17 loci associés à la glycémie ou insulinémie à jeun contribuent significativement au risque de survenue d'un DT2 commun (en prenant en compte la correction de Bonferroni) : *ADCY5*, *PROX1*, *GCK*, *GCKR*, *DGKB-TMEM195*, et les gènes à risque de DT2 d'ores et déjà connus *TCF7L2* et *SLC30A8* (**Figure 39**). Ce constat souligne le fait que l'amplitude de l'effet d'un SNP sur la glycémie à jeun ne prédit pas automatiquement l'effet conjoint du SNP sur le risque de DT2. Par exemple, les deux SNPs localisés au locus des gènes *ADCY5* et *MADD* ont la même MAF et le même effet sur la glycémie à jeun, pourtant le premier contribue au DT2 (OR = 1,12 ; $P = 5,5 \times 10^{-21}$) alors que le deuxième absolument pas (OR = 1,01 ; $P = 0,3$). Cela suggère qu'une partie seulement des loci associés à la glycémie à jeun dans une gamme physiologiquement normale est aussi associée à la glycémie à jeun à des niveaux pathologiques entraînant un DT2. Autrement dit, l'augmentation faible (d'après l'effet des SNPs identifiés) de la glycémie à jeun ne constitue pas forcément une caractéristique clinique d'un futur DT2.

Inversement, le consortium DIAGRAM+, avec l'aide des données générées par MAGIC, a récemment montré dans sa dernière étude (133), que l'amplitude des effets des gènes de susceptibilité au DT2 sur le risque de survenue de la maladie et sur l'augmentation de la glycémie à jeun n'était pas corrélée (**Figure 40**). Cependant, la grande majorité de ces gènes ont avant tout un effet sur la sécrétion insulinaire plutôt que sur la sensibilité à

l'insuline (**Figure 41**). Ces méta-analyses d'études GWAS montrent bien l'extraordinaire diversité physiologique des gènes qui modulent la glycémie. Des analyses plus précises des effets biologiques de chacun de ces gènes (en biologie cellulaire et *in vivo* chez l'animal et chez l'homme) seront nécessaires pour mieux comprendre l'emboîtement des pièces de ce puzzle complexe.

Comme je l'ai abordé dans l'introduction (cf partie III.6/), l'héritabilité de la glycémie à jeun (et de l'HOMA-B) est d'environ 30%. La présente étude, munie pourtant d'une très grande puissance statistique, n'explique que 10% environ de la variation de la glycémie à jeun (et de l'HOMA-B). On retrouve ainsi le constat de '*dark matter*' établi suite aux études GWAS dans le DT2 commun. L'utilisation des GWAS permet certes d'identifier des nouvelles étiologies génétiques dans la maladie étudiée ou dans la variation d'un trait, mais ne permet pas une compréhension génétique et physiologique exhaustive. L'hypothèse d'une contribution majeure des variants communs est donc fautive mais a quand-même permis, comme ici, des découvertes inattendues et la révélation de nouvelles voies d'investigations moléculaires dans le DT2 commun. Par ailleurs, il est important de noter que malgré la part d'ombre dans l'héritabilité de la glycémie à jeun, la différence de 0,4 mmol/l du trait observée entre les porteurs de moins de 12 allèles à risque et les porteurs de plus de 23 allèles à risque est réellement pertinente d'un point de vue clinique (cf article 3) : **i/** cette différence représente 25% de la distribution de la glycémie à jeun ; **ii/** cette différence est associée à un risque compris entre 54 et 73% de devenir diabétique de type 2.

Concernant la résistance à l'insuline et malgré le fait que l'HOMA-IR ait presque la même héritabilité que l'HOMA-B (c'est-à-dire un peu moins de 30%) [l'insulinémie à jeun aurait une héritabilité un peu plus basse autour de 20% (159)], l'étude MAGIC n'a permis d'identifier qu'une seule association nouvelle (sous le seuil de Bonferroni). Il est important de noter qu'aucune association dans cet article 3 n'a été initialement ajustée à l'IMC (les régressions linéaires n'ont été ajustées qu'à l'âge, au sexe et aux cohortes). Ainsi, on ne peut soupçonner qu'un ajustement à l'IMC ait pu « capter » les effets d'insulino-résistance des SNPs. A noter que cet ajustement a ensuite été réalisé et n'a pas changé l'effet des SNPs significativement associés à la glycémie à jeun (HOMA-B) ou à l'insulinémie à jeun (HOMA-IR). Ainsi, le constat reste assez négatif. La piste génétique de l'insulino-résistance, dramatiquement obscure jusqu'à présent, serait peut-être à trouver dans : **i/** des variants plus rares, à effets plus forts ; **ii/** des interactions gènes-environnement ; **iii/** des effets épigénétiques ; **iv/** une mesure meilleure de l'insulino-résistance mais qui se heurte à sa faisabilité dans un grand nombre de sujets (159).

2/ La génétique des réponses glycémique et insulinémique à une HGPO, et son impact sur les risques de DT2 commun (article 4)

La glycémie deux heures après une HGPO (glycémie-2h) mesure la « tolérance au glucose », qui était autrefois utilisée par l’OMS pour diagnostiquer le DT2 ($\geq 11\text{mmol/l}$) (cf supra ; Introduction, partie I.2/). La sécrétion insulinaire contrôle à la fois la glycémie à jeun et la glycémie stimulée par un stress glucidique, mais il existe par ailleurs d’autres mécanismes hormonaux comme les acteurs de l’effet incrétine, qui régulent de façon distincte la glycémie après une HGPO (cf supra ; Introduction, partie II.). En outre, nombre d’études épidémiologiques ont montré que la glycémie-2h prédit la morbidité et la mortalité des maladies cardiovasculaires, même dans des gammes non-diabétiques d’hyperglycémie et indépendamment du niveau de glycémie à jeun. Enfin, la glycémie-2h est un trait très héritable (40%).

Ainsi, de la même façon que pour la glycémie et l’insulinémie à jeun, il nous a semblé pertinent d’identifier par GWAS des loci susceptibles de contribuer à la variation de la glycémie-2h et *in fine* d’étudier leurs effets sur le risque de survenue d’un DT2, afin de découvrir de nouvelles pistes d’investigation moléculaire dans cette maladie. Pour ce faire, nous avons travaillé avec le consortium MAGIC afin d’optimiser au maximum la puissance statistique. En effet, les cohortes dont les participants ont subi des tests HGPO sont assez rares et généralement de petite taille, d’où l’avantage et l’utilité de joindre ces études en une grande méta-analyse. Dans l’article 4, la méta-analyse de neuf GWAS incluant 15 234 participants non-diabétiques Européens, suivie d’une réplique de 29 SNPs chez 30 620 sujets non-diabétiques, a permis de révéler cinq loci significativement associés à la glycémie-2h (après correction de Bonferroni et ajustement à l’âge, au sexe, à l’IMC et aux cohortes) : ***GIPR***, ***VPS13C***, ***ADCY5*** et les loci déjà connus pour influencer ce trait ***GCKR*** et ***TCF7L2***. L’ajustement supplémentaire avec la glycémie à jeun a permis d’augmenter l’effet de l’allèle mineurs des SNPs situés au locus des gènes ***GCKR***, ***GIPR*** et ***VPS13C*** ce qui suggère un rôle spécifique de ces SNPs dans la régulation de la glycémie post-prandiale. Cet ajustement diminue au contraire l’effet des SNPs situés dans ***ADCY5*** et ***TCF7L2***. Par ailleurs, parmi les trois nouveaux loci, seulement ***ADCY5*** contribue à une augmentation du risque de DT2.

GIPR code le récepteur à l’incrétine GIP. L’allèle mineur du SNP augmentant significativement la glycémie-2h était aussi associé à une diminution de l’indice insulino-génique (ce qui signifie la diminution de la première phase de la sécrétion

inuslinique), à une diminution de l'aire sous la courbe du ratio insuline/glucose (qui représente une mesure de la réponse insulinaire durant les deux heures de test HGPO) et à une diminution de l'insulinémie à deux heures après HGPO (insulinémie-2h). Aucune association de *GIPR* avec la glycémie à jeun n'a été révélée ni après HGPIV (ce qui est en accord avec la sécrétion présumée d'incrétines après ingestion mais pas injection de glucose). Ainsi, ces résultats coïncident avec les phénotypes de la souris KO *GIPR*^{-/-} qui montre une légère intolérance au glucose et une réduction de la sécrétion insulinaire après une HGPO, mais une glycémie à jeun normale ainsi qu'une sécrétion insulinaire normale après une hyperglycémie provoquée par injection intrapéritonéale (160).

ADCY5 code une des adénylate cyclases connues pour être impliquées dans la voie de signalisation de l'AMPc essentielle à la sécrétion insulinaire via la voie des incrétines (cf supra ; Introduction, partie II.1/). L'allèle mineur du SNP augmentant significativement la glycémie-2h était aussi associé à la baisse de l'insulinémie-2h mais absolument pas à l'indice insulino-génique ni à l'aire sous la courbe du ratio insuline/glucose. Ainsi, ce SNP ne jouerait pas directement sur la sécrétion insulinaire post-prandiale. Il est écrit dans l'article 4 (que je co-signe pourtant) qu'une faible expression du gène *ADCY5* dans les cellules beta humaines supporte l'idée que le SNP situé dans ce gène ne jouerait pas directement sur les cellules beta, ce qui me semble peu pertinent. En effet, cette expression est relative : au niveau des cellules beta, c'est l'expression de *GLIS3* qui avait été choisie comme référence. Ainsi, on ne peut pas parler d'expression 'faible' tout court : elle était faible par rapport à l'expression de *GLIS3* qui code une protéine complètement différente. L'important était à mon avis la présence ou l'absence d'expression... si une présence est révélée, je pense qu'on ne peut rien conclure. Quoiqu'il en soit, l'étiologie physiologique de la contribution du SNP à une augmentation du risque de DT2, de la glycémie à jeun et de la glycémie-2h reste pleinement obscure.

VPSI3C code une protéine vacuolaire présente dans les cellules beta et dont la fonction est peu connue. L'allèle mineur du SNP augmentant significativement la glycémie-2h était aussi associé à la baisse de l'insulinémie-2h et à une diminution de l'indice insulino-génique (mais association nominale). Le même allèle n'était pas associé à l'aire sous la courbe du ratio insuline/glucose. Ainsi, là encore, l'association initiale avec la glycémie-2h reste obscure d'un point de vue physiologique.

Ainsi, malgré ces travaux planétaires gigantesques, la corrélation entre les gènes modulant la glycémie à jeun, la glycémie-2h, les indices physiologiques associés et *in fine* le risque de DT2 reste peu cohérente. Il manque une vision d'ensemble de ces mécanismes

complexes. Mais quoiqu'il en soit, l'utilisation des GWAS pour les traits glycémiques a permis d'identifier de nouveaux gènes à risque dans le DT2 et d'ouvrir de nouvelles voies d'investigation moléculaire.

II. GÉNÉTIQUE DE L'HÉMOGLOBINE GLYQUÉE

Article 1.

“Genetic variant in *HK1* is associated with pro-anemic state and A1C but not other glycemic control related traits”

(Diabetes. 2009 Nov;58(11):2687-97)

Bonnefond A, Vaxillaire M, Labrune Y, Lecoœur C, Chèvre JC, Bouatia-Naji N, Cauchi S, Balkau B, Marre M, Tichet J, Riveline JP, Hadjadj S, Gallois Y, Czernichow S, Hercberg S, Kaakinen M, Wiesner S, Charpentier G, Lévy-Marchal C, Elliott P, Jarvelin MR, Horber F, Dina C, Pedersen O, Sladek R, Meyre D, Froguel P.

Article 2.

“Common variants at ten genomic loci influence hemoglobin A1C levels via glyceemic and non-glyceemic pathways”

(Diabetes. 2010 Sep; Epub ahead of print)

Soranzo N, Sanna S, Wheeler E, Gieger C, Radke D, Dupuis J, Bouatia-Naji N, Langenberg C, Prokopenko I, Stolerman E, Sandhu MS, Heeney MM, Devaney JM, Reilly MP, Ricketts SL, Stewart AF, Voight BF, Willenborg C, Wright B, Altshuler D, Arking D, Balkau B, Barnes D, Boerwinkle E, Böhm B, **Bonnefond A**, Bonnycastle LL, Boomsma DI, Bornstein SR, Böttcher Y, Bumpstead S, Burnett-Miller MS, Campbell H, Cao A, Chambers J, Clark R, Collins FS, Coresh J, de Geus EJ, Dei M, Deloukas P, Döring A, Egan JM, Elosua R, Ferrucci L, Forouhi N, Fox CS, Franklin C, Franzosi MG, Gallina S, Goel A, Graessler J, Grallert H, Greinacher A, Hadley D, Hall A, Hamsten A; on behalf of Procardis Consortium, Hayward C, Heath S, Herder C, Homuth G, Hottenga JJ, Hunter-Merrill R, Illig T, Jackson AU, Jula A, Kleber M, Knouff CW, Kong A, Kooner J, Köttgen A, Kovacs P, Krohn K, Kühnel B, Kuusisto J, Laakso M, Lathrop M, Lecoeur C, Li M, Li M, Loos RJ, Luan J, Lyssenko V, Mägi R, Magnusson PK, Mälärstig A, Mangino M, Martínez-Larrad MT, März W, McArdle WL, McPherson R, Meisinger C, Meitinger T, Melander O, Mohlke KL, Mooser VE, Morken MA, Narisu N, Nathan DM, Nauck M, O'Donnell C, Oexle K, Olla N, Pankow JS, Payne F, Peden JF, Pedersen NL, Peltonen L, Perola M, Polasek O, Porcu E, Rader DJ, Rathmann W, Ripatti S, Rocheleau G, Roden M, Rudan I, Salomaa V, Saxena R, Schlessinger D, Schunkert H, Schwarz P, Seedorf U, Selvin E, Serrano-Ríos M, Shrader P, Silveira A, Siscovick D, Song K, Spector TD, Stefansson K, Steinthorsdottir V, Strachan DP, Strawbridge R, Stumvoll M, Surakka I, Swift AJ, Tanaka T, Teumer A, Thorleifsson G, Thorsteinsdottir U, Tönjes A, Usala G, Vitart V, Völzke H, Wallaschofski H, Waterworth DM, Watkins H, Wichmann HE, Wild SH, Willemsen G, Williams GH, Wilson JF, Winkelmann J, Wright AF; WTCCC, Zabena C, Zhao JH, Epstein SE, Erdmann J, Hakonarson HH, Kathiresan S, Khaw KT, Roberts R, Samani NJ, Fleming MD, Sladek R, Abecasis G, Boehnke M, Froguel P, Groop L, McCarthy MI, Kao WH, Florez JC, Uda M, Wareham NJ, Barroso I, Meigs JB.

La génétique de l'hémoglobine glyquée et son impact sur le risque de DT2

L'hémoglobine glyquée (HbA1c) résulte de la glycation (c'est-à-dire la modification non-enzymatique et majoritairement irréversible due au glucose) de la chaîne β des molécules d'hémoglobine transportant le dioxygène au sein des érythrocytes. L'HbA1c est devenue l'indice le plus utilisé pour évaluer chez les patients diabétiques l'efficacité des traitements anti-diabétiques sur le contrôle glucidique à long terme, car l'HbA1c reflète la concentration plasmatique moyenne du glucose tout au long de la vie d'un érythrocyte (c'est-à-dire environ trois mois chez un homme). En outre, comme abordé dans l'introduction (cf partie I.2/), l'ADA incite la profession médicale à utiliser l'HbA1c pour diagnostiquer un DT2 ($\geq 6,5\%$). Cependant, il est bien connu qu'en plus de la glycémie ambiante, la variabilité de l'HbA1c dépend de maladies qui modifient le renouvellement des érythrocytes (anémie hémolytique, malaria), d'anémies chroniques héréditaires ou de maladies génétiques associées à un mauvais stockage du fer (161-164).

L'hémoglobine glyquée a une forte composante génétique par rapport aux autres traits du contrôle glycémique : l'héritabilité de ce trait a en effet été évaluée entre 47 et 59% (165). Une première étude GWAS de l'HbA1c impliquant 14 618 participantes non-diabétiques Européennes, suivie d'une faible réplique chez 455 individus non-diabétiques, a mis en évidence quatre loci significativement associés à la variabilité de l'HbA1c : *HK1* codant l'hexokinase 1, et les loci d'ores et déjà connus pour influencer ce trait *GCK*, *SLC30A8* et *G6PC2* (166). Cette étude était un peu frustrante dans le sens où aucun autre trait métabolique n'avait été étudié à partir de ces loci, ni même un cas / contrôle dans le DT2 commun (ce qui semblait logique vu son utilisation souhaitée dans le diagnostic du DT2). Par ailleurs, une chose m'a frappée à la lecture de cet article et de la littérature se rapportant à l'hexokinase 1 : le peu d'éléments biologiques connus supportant la conclusion des auteurs que forcément cette hexokinase devait jouer un rôle majeur dans le contrôle de la glycémie. Certes, HK1, comme les trois autres isoenzymes de la famille des hexokinases, permet d'engager le glucose dans la voie de la glycolyse au niveau du cytoplasme cellulaire. *HK1* est en outre exprimé dans la grande majorité des cellules et des tissus dépendant de la capture de glucose pour leurs besoins énergétiques et métaboliques. Ainsi, on avait pu aisément penser que l'association du locus *HK1* avec l'HbA1c était très probablement expliquée par la voie glucidique, c'est-à-dire par une contribution de *HK1* à la variation des traits métaboliques (et *in fine* à un risque de DT2). Cependant, des mutations non-synonymes et des délétions dans le site actif de HK1 entraînant des anémies hémolytiques très sévères sans apparemment entraîner de diabète. Les

souris *Downeast Anemia* (dea) ayant une insuffisance au niveau d'HK1 montrent le même phénotype d'anémie hémolytique sévère (167).

Nous avons donc dans un premier temps cherché à répliquer ce signal d'association au niveau d'*HK1* avec l'HbA1c chez 6 953 sujets Européens non-diabétiques. Nous avons bien confirmé l'association fortement significative entre l'allèle mineur du SNP rs7072268 au locus du gène *HK1* et une augmentation de l'HbA1c ($\beta = 0,028_{[0,016;0,041]}$ % ; $P = 1,53 \times 10^{-5}$). Puis, comme il est connu qu'une anémie peut influencer l'HbA1c, nous avons supposé dans l'article 1 que le SNP rs7072286 pourrait contribuer à la variabilité des traits associés aux érythrocytes et donc indirectement de l'HbA1c, indépendamment de la concentration ambiante de glucose. Nous avons donc testé par sonde TaqMan l'association du SNP rs7072268 avec les traits métaboliques à jeun (glycémie et insulïnémie à jeun, HOMA-B et HOMA-IR) chez 18 694 individus non-diabétiques Européens, mais aucune association significative n'a été identifiée. Par ailleurs, aucune contribution du SNP rs7072268 à la variabilité des traits métaboliques durant un test HGPO (glycémies et insulïnémies durant le test, indice insulïnogénique, indice de disposition, indice de sensibilité à l'insuline) n'a été identifiée ($N = 4\ 789$). En outre, le SNP n'était pas non plus associé à une augmentation du risque de DT2 ($N_{cas} = 7\ 447$; $N_{contrôles} = 5\ 380$; et confirmation par le consortium DIAGRAM+). En revanche, nous avons identifié une association significative entre l'allèle mineur du SNP rs7072268 et une diminution de l'hémoglobine ($N = 11\ 492$; $\beta = -0,044_{[-0,071;-0,017]}$ g/dl ; $P = 1,43 \times 10^{-3}$) et du taux d'hématocrite ($N = 11\ 492$; $\beta = -0,13_{[-0,20;-0,06]}$ % ; $P = 2,26 \times 10^{-4}$). L'effet significatif du locus *HK1* (en deçà du seuil de Bonferroni) sur ces deux traits érythrocytaires a dernièrement été confirmé par une méta-analyse de GWAS réalisée par le consortium CHARGE ($N = 24\ 167$) (168).

Ainsi nos données suggèrent que les variants d'*HK1* augmentent l'HbA1c via leurs effets anémiques ce qui peut avoir des implications importantes dans le diagnostic du DT2 commun. Par ailleurs, au regard de la fonction clef de HK1 dans le métabolisme cellulaire du glucose, il était assez surprenant que des variants communs de *HK1* associés à une augmentation de l'HbA1c ne contribuent pas à la variabilité d'autres marqueurs du contrôle glycémique, mais en revanche aient un effet pro-anémique. Par conséquent, comme nombre de gènes peuvent avoir des effets pléiotropes, les GWAS peuvent certes détecter des associations réelles comme dans *HK1* mais peuvent conduire à des conclusions fausses concernant la causalité de ces associations. De façon systématique, il faudrait donc que les données issues de GWAS soient analysées simultanément pour plusieurs traits a priori

corrélés. Lors de sa parution, l'article 1 a fait l'objet d'un commentaire dans l'éditorial du journal *Diabetes*, disponible en annexe (**Annexe 2**).

Nous avons ensuite collaboré avec le consortium MAGIC pour réaliser une méta-analyse de GWAS de l'HbA1c (article 2), plus puissante que l'étude GWAS initiale du même trait car elle a rassemblé 46 368 participants Européens non-diabétiques, issus de 31 cohortes. Cette méta-analyse a permis d'identifier 10 loci associés significativement à l'HbA1c (après correction de Bonferroni) : *FN3K*, *HFE*, *TMPRSS6*, *ANK1*, *SPTA1*, *ATP11A/TUBGCP3*, et les loci déjà connus pour influencer ce trait *HK1*, *MTNR1B*, *GCK* et *G6PC2* (*SLC30A8* initialement identifié par Paré et al. n'a pas été confirmé ; dans l'article 1, nous n'avons pas trouvé non plus d'association significative à ce locus). Comme dans l'article 1, nous nous sommes demandé si les loci associés à l'HbA1c contribuaient de façon significative à la variabilité des traits reliés au DT2 et/ou aux érythrocytes. Les loci *GCK*, *MTNR1B* et *G6PC2* étaient déjà connus pour être associés à la glycémie à jeun et à l'HOMA-B : les allèles augmentant l'HbA1c contribuaient aussi à augmenter la glycémie à jeun ou à diminuer l'HOMA-B. Et seulement *GCK* et *MTNR1B* étaient aussi associés à une augmentation du risque de survenue d'un DT2. L'ajout de la glycémie à jeun dans la régression linéaire testant l'effet des SNPs sur l'HbA1c a nettement diminué la contribution des loci *GCK*, *MTNR1B* et *G6PC2* à la variabilité de l'HbA1c, ce qui suggère que l'impact de ces loci sur l'HbA1c est avant tout conduit par la voie glucidique. Ce résultat n'a pas été observé pour les sept autres loci suggérant une absence de médiation de ces loci par la glycémie ambiante. Concernant les traits reliés aux érythrocytes, les allèles mineurs des SNPs situés au locus des gènes *HFE* et *TMPRSS6* étaient significativement associés (après correction de Bonferroni) à une diminution d'hémoglobine, du fer, du volume globulaire moyen et de la concentration moyenne en hémoglobine, et à une augmentation de la concentration en transferrine. En outre, *SPTA1*, *ANK1* et *HK1* étaient nominalement associés au volume globulaire moyen et/ou à l'hémoglobine. Vu les derniers GWAS publiés sur les traits érythrocytaires et la présence du locus *HK1* dans les signaux d'association significatifs, on peut noter un manque de puissance de la présente étude pour les traits érythrocytaires ($N \sim 7\ 500$). Par ailleurs, l'ajout de ces traits érythrocytaires dans la régression linéaire testant l'effet des SNPs sur l'HbA1c a diminué la contribution des loci *HFE*, *TMPRSS6* et *HK1* à la variabilité de l'HbA1c mais la différence n'était pas significative, confirmant un manque de puissance de l'étude. Les fonctions des protéines codées par les sept gènes non-associés aux traits glycémiques sont amplement étayées dans l'article 2. Il est très intéressant de noter que des mutations délétères

dans la majorité de ces gènes entraînaient des anémies ou des problèmes de stockage du fer dans les érythrocytes.

La présente étude, munie pourtant d'une très grande puissance statistique concernant l'HbA1c, n'explique que 5% environ de la variation de l'HbA1c. On retrouve ainsi le constat de *dark matter* post-GWAS. Cependant, en utilisant seulement les sept loci non-associés à la voie glucidique, la différence de 0.19% de l'HbA1c observée entre les porteurs de moins de 2 allèles à risque et les porteurs de plus de 12 allèles à risque est pertinente d'un point de vue clinique et pose la question de l'utilisation de l'HbA1c dans le diagnostic du DT2. En effet, en prenant en compte cette différence (basée sur seulement sept loci, soit moins de 5% de l'héritabilité de l'HbA1c) à l'échelle de la population générale et en prenant le seuil d'HbA1c $\geq 6,5\%$ pour diagnostiquer un DT2, environ 2% de la population auraient un faux diagnostic de DT2. La mesure de l'HbA1c comporte en outre des problèmes de standardisation et de façon plus importante encore, de coûts très élevés. En bref, on savait d'un point de vue empirique que la variabilité de l'HbA1c ne dépendait pas seulement de la glycémie ambiante. Ces études génétiques ont permis de mieux quantifier la part d'ombre de ce trait : à la fois dans sa composante génétique mais aussi dans sa composante érythrocytaire, indépendante de la glycémie. Reste encore beaucoup d'investigations car 95% de la part génétique influençant ce trait restent à être découverts ! La partie suivante de cette thèse (concernant les perspectives) donneront quelques pistes d'étude post-GWAS.

III. ÉTUDES FONCTIONNELLES DE VARIANTS GÉNÉTIQUES ASSOCIÉS À LA GLYCÉMIE

Article 1.

“Genetic and functional assessment of the role of the rs13431652-A and rs573225-A alleles in the *G6PC2* promoter that strongly associate with elevated fasting glucose levels”

(Diabetes. 2010 Oct;59(10):2662-71)

Bouatia-Naji N*, **Bonnefond A*** (*co-first authors), Baerenwald DA, Marchand M, Bugliani M, Marchetti P, Pattou F, Printz RL, Flemming BP, Umunakwe OC, Conley NL, Vaxillaire M, Lantieri O, Balkau B, Marre M, Lévy-Marchal C, Elliott P, Jarvelin MR, Meyre D, Dina C, Oeser JK, Froguel P, O'Brien RM.

Article 2.

“Alteration of KLF11-regulated insulin biosynthesis in neonatal diabetes mellitus”

(submitted to J Clin Invest – under external review)

Bonnefond A*, Lomberk G* (*co-first authors), Buttar N, Busiah K, Vaillant E, Lobbens S, Yengo L, Mignot B, Simon A, Scharfmann R, Neve B, Tanyolac S, Hodoglugil U, Pattou F, Cavé H, Iovanna J, Stein R, Polak M, Vaxillaire M, Froguel P, Urrutia R.

1/ « Affinage » du signal d'association avec la glycémie à jeun au locus *G6PC2/ABCB11* et étude fonctionnelle des variants communs (à effets faibles) semblant porter l'association

Comme je l'ai indiqué dans l'introduction (partie III.6/), la première étude publiée de GWAS analysant la glycémie à jeun a été réalisée au laboratoire et avait identifié le SNP fréquent rs560887, situé au locus du gène *G6PC2*, associé à la glycémie à jeun. D'autres études ont confirmé ce résultat, dont la grande méta-analyse réalisée par le consortium MAGIC (cf supra ; Présentation des travaux, partie I. Article 3) qui a rapporté que ce SNP était le plus fortement associé en terme de significativité mais aussi d'effet sur la glycémie à jeun ($\beta = -0,075_{[-0,072;-0,078]}$ mmol/l et $P = 8,5 \times 10^{-122}$). Cependant, comme je l'ai indiqué dans l'introduction (cf partie III.6/), deux gènes candidats, *G6PC2* et *ABCB11*, pouvaient de manière plausible contribuer à la variabilité de la glycémie à jeun, d'autant plus que le SNP rs560887 est en fort LD ($r^2 > 0.7$) avec un ensemble de SNPs situés dans le gène *ABCB11* (**Figure 42**).

Nous avons donc, dans un premier temps, cherché à affiner le signal d'association en génotypant par sonde TaqMan 9 532 sujet Européens normoglycémiques, issus de quatre populations différentes :

- l'un des deux SNPs fréquents situés dans *ABCB11*, rapportés par Chen et al. comme étant fortement associés à la glycémie à jeun, **le SNP rs853789** (139),
- les deux seuls SNPs fréquents en très fort LD avec le SNP rs560887 ($r^2 > 0,80$ dans la population HapMap Européenne), situés dans le promoteur de *G6PC2*, **les SNPs rs13431652** (promoteur distal) **et rs573225** (promoteur proximal) (**Figure 43**),
- **et le SNP rs560887.**

Sans surprise vu leur fort LD, nous avons trouvé que l'allèle mineur des quatre SNPs était associé de manière très significative à une baisse de la glycémie à jeun ($\beta < -0.062$ mmol/l et $P < 1,1 \times 10^{-25}$). Cependant, quand nous avons introduit le SNP rs560887, rs13431652, ou rs573225 dans la régression linéaire conditionnée modélisant la glycémie à jeun incluant le SNP rs853789, l'âge, le sexe, l'IMC et les cohortes, l'association du SNP rs853789 avec la glycémie à jeun était très fortement réduite, alors qu'elle restait invariable pour les autres SNPs localisés dans *G6PC2* et dans son promoteur. Ce qui suggère que dans nos populations testées, l'effet du SNP rs853789 situé dans *ABCB11* était principalement conduit par les trois variants en fort LD situés au locus du gène *G6PC2*. Concernant ces trois

SNPs, nous n'avons pas réussi à départager leurs effets vu leur (trop) fort LD ($r^2 > 0,88$) en utilisant les régressions conditionnées. Comme le SNP rs560887 est situé dans une zone d'épissage de *G6PC2* et comme les deux autres SNPs sont situés dans des régions promotrices de *G6PC2*, nous avons pensé qu'ils pouvaient jouer un rôle sur l'expression de *G6PC2*. Ainsi, nous avons réalisé une étude eQTL de ces trois SNPs en utilisant 24 échantillons d'îlots pancréatiques humains avec les 24 échantillons correspondants d'ADN génomique. Nous n'avons trouvé aucune corrélation significative entre l'expression de *G6PC2* dans les îlots et chacun des trois SNPs testés. Nous ne pouvions rien conclure de ce résultat vu la faible puissance de l'étude (ces échantillons sont rares mais si précieux... il serait intéressant de reconduire l'étude en s'appuyant sur davantage d'échantillons).

Comme la génétique ne pouvait plus nous aider à départager ces trois SNPs et *in fine* à identifier une causalité de l'association, nous avons entrepris des analyses fonctionnelles au niveau des variants du promoteur afin de tester leur capacité à altérer la fixation de facteurs de transcription de *G6PC2*, et donc l'expression de *G6PC2*. A partir d'une recherche *in silico* de facteurs de transcription pouvant se fixer aux zones comprenant les deux SNPs, suivie d'analyses de gènes de fusion (via la construction de deux plasmides incluant le promoteur distal ou proximal de *G6PC2*) et de retard sur gel, nous avons montré que :

- L'allèle du SNP rs13431652 situé dans le promoteur distal, augmentant la glycémie à jeun, altérait la fixation du facteur de transcription nucléaire NF-Y et augmentait l'expression du gène *G6PC2* dans les lignées de cellules beta murines β TC3. Cette corrélation est cohérente avec la fonction supposée de *G6PC2* (d'après le phénotype de la souris *G6pc2*^{-/-} ; cf supra, Introduction, partie III.6/) car une élévation de l'expression du gène serait corrélée à une opposition de l'action de GCK et donc de l'utilisation du glucose, entraînant une élévation de la glycémie.
- L'allèle du SNP rs573225 situé dans le promoteur proximal, augmentant la glycémie à jeun, altérait la fixation du facteur de transcription FOXA2 (autrement connu sous le nom HNF3 β) mais diminuait l'expression de *G6PC2*, ce qui n'était pas cohérent avec la fonction supposée de *G6PC2*. Plusieurs lignées de cellules beta murines ont été testées ainsi que plusieurs plasmides. Le résultat restait le même.

Ainsi, les résultats fonctionnels réalisés dans cette étude suggèrent un rôle potentiel du SNP rs13431652 dans la causalité de l'association entre le locus *G6PC2* et la glycémie à jeun. Cependant, nos données génétiques n'ont pas éliminé le SNP intronique rs560887 qui pourrait

bien avoir un rôle à jouer dans l'épissage de *G6PC2*. Différentes isoformes de *G6PC2* ont en effet été rapportées dans la littérature (169) et nous avons montré à partir d'analyses *in silico* que l'allèle diminuant la glycémie à jeun avait un score d'épissage plus bas (144). Ce ne sont que des analyses fonctionnelles qui pourront répondre à cette hypothèse.

D'autre part, nous n'avons pas totalement investigué la zone d'association d'un point de vue génétique. En effet, seul un séquençage approfondi de la zone suivi d'un génotypage des SNPs retrouvés dans de plus larges populations (étude dite de *fine-mapping*) permettraient d'identifier de façon exhaustive des SNPs plus rares (en LD à fort D' mais faible r^2 avec les SNPs rapportés) pouvant potentiellement jouer un rôle dans la causalité de l'association. Ensuite, là-encore, seules des analyses fonctionnelles pourraient confirmer ou réfuter les associations perçues.

Mais l'on ressent bien à travers cette étude que l'analyse fonctionnelle de variants à faible effet reste un véritable défi. Ici, il nous semblait que l'investigation était réalisable car deux des trois SNPs sont localisés dans des régions promotrices. Ainsi, les expériences étaient assez « simples » à mettre en place. Cependant les résultats peuvent être surprenants et même dans ce cas de figure, nous ne pouvions être sûrs à 100% de la véracité du protocole utilisé. En effet, concernant le SNP rs573225 par exemple, nous avons clairement montré qu'il avait un rôle dans la fixation de FOXA2, donc que le SNP était fonctionnel, mais que l'activité consécutive du promoteur sur l'expression de *G6PC2* n'était pas cohérente avec les hypothèses et la fonction de *G6PC2*. Nous avons indiqué que soit la discordance était réelle, soit elle provenait du protocole même d'investigation : utilisation de modèle transitoire (donc absence de la structure de la chromatine), utilisation de promoteur tronqué, utilisation de lignées cellulaires avec des profils d'expression génique bien particuliers et discordants des « vraies » cellules beta humaines... Ainsi, des confirmations suivant d'autres modèles d'investigations seraient très utiles. Par ailleurs, nous ne pouvons écarter le rôle d'autres facteurs de transcription au niveau des deux SNPs.

2/ Découverte et étude fonctionnelle d'une mutation à effet très fort dans le promoteur du gène de l'insuline (*INS*), responsable de diabète néonatal (DN)

Comme je l'ai abordé dans l'introduction (partie III.1/), le DN, qui représente une forme monogénique de DT2, est une maladie à étiologie génétique hétérogène et une part importante des cas reste non élucidée. Des mutations non-synonymes dans le gène *INS* peuvent entraîner un DN, voire un diabète de type MODY selon la position de la mutation (cf

supra ; Introduction, partie III.1/). Dernièrement, une étude a montré que des mutations homozygotes dans le promoteur et la région 3'UTR du gène *INS* pouvaient entraîner des formes récessives de DN au sein de familles consanguines (170). L'étude avait montré que les mutations pouvaient entraîner une diminution de la biosynthèse insulinaire mais les mécanismes impliqués n'avaient absolument pas été abordés et les données cliniques des patients mutés restaient assez superficielles.

Sachant que le promoteur de *INS* est régulé par un large spectre de facteurs de transcription ubiquitaires ou au contraire spécifiques de la cellule beta (comme PDX1, NEUROD1, MAFA, PAX6), le but de notre étude (article 2) a été de comprendre quelles altérations dans la régulation transcriptionnelle du gène *INS*, causées par une mutation homozygote au niveau du promoteur, pouvaient entraîner un DN.

En premier lieu, nous avons séquencé le promoteur du gène *INS* chez six patients atteints de DN, issus de familles consanguines, et inclus dans le registre de patients du Réseau Français pour l'Étude du Diabète Néonatal. Nous avons identifié une mutation homozygote c.-331C>G (c'est-à-dire un changement de cystéine en guanine, à 331 paires de bases du codon départ de la transcription ATG), chez deux patients d'origine turque atteints de DN transitoire. Les parents non-diabétiques de chaque patient étaient hétérozygotes pour la mutation. Cette mutation est localisée sur un site très conservé inter-espèces et elle n'a pas été retrouvée chez contrôles adultes non-diabétiques (355 d'origine Européenne et 747 d'origine Turque). Les deux patients avaient tous deux un retard sévère de croissance intra-utérin à la naissance, une forte hyperglycémie (14,8 mmol/l pour le proband 1 et 10,0 mmol/l pour le proband 2), nécessitant une insulinothérapie. Le traitement à l'insuline a été stoppé à 5 mois pour le proband 1 et 48 jours pour le proband 2. Le proband 2 (et sa famille) a malheureusement été perdu de vue. Par contre, nous avons pu suivre l'évolution du diabète du proband 1 et réaliser quelques investigations cliniques dans sa famille. Après une rémission de son diabète à 5 mois, il a rechuté à 22 mois, nécessitant une insulinothérapie pendant 2 mois, et a finalement rechuté de nouveau à 28 mois (hyperglycémie à 22 mmol/l ; traitement sous insuline). Ceci montre un équilibre glycémique très instable. Durant les phases de rémission, la concentration de proinsuline et le ratio proinsuline / insuline du proband 1 étaient tout à fait normaux, montrant une absence totale d'altération des changements post-traductionnels de l'insuline. De manière intéressante, les grands-parents paternels du proband 1, qui sont cousins germains, sont tous deux porteurs hétérozygotes de la mutation c.-331C>G, et sont atteints de DT2 (traité par sulfonyles et/ou biguanides), ce qui pourrait

suggérer que si la mutation était fonctionnelle, elle pourrait entraîner, à l'état hétérozygote, un DT2 plus tardif.

Par des analyses de gènes rapporteurs, nous avons montré que la mutation entraînait une extinction de plus de 95% de l'activité du promoteur de *INS*, dans les lignées de cellules beta de rat INS1 et de souris β TC3. Afin de savoir comment cette mutation pouvait entraîner une telle diminution de la biosynthèse d'insuline, nous avons entrepris des analyses fonctionnelles à cinq niveaux (les deux premiers servant d' « entonnoir » et les trois derniers confirmant notre résultat) :

- Des analyses *in silico* ont montré que la mutation est localisée dans un site putatif de fixation des 16 facteurs de transcription *Krüppel-like factors* (KLFs) (CACCC). Comme le DN est avant tout caractérisé par une altération sévère de la sécrétion insulinaire au niveau des cellules beta pancréatiques, nous avons en premier lieu cherché à identifier quels KLFs étaient exprimés dans des échantillons humains d'îlots et de cellules beta pancréatiques, en utilisant des données transcriptomiques par puce à ADN. Nous avons identifié sept KLFs (*KLF1*, *KLF7*, *KLF8*, *KLF10*, *KLF12*, *KLF14* et *KLF16*) qui n'étaient pas exprimés ni dans les îlots ni dans les cellules beta. Nous les avons donc écartés de nos candidats potentiels.
- Par des analyses de gènes rapporteurs (en co-transfectant le plasmide contenant le promoteur humain de l'insuline muté ou sauvage, avec chacune des 16 constructions plasmidiques de KLFs humains), nous avons montré que seul KLF11 activait le promoteur de *INS* dans les deux lignées de cellules beta INS1 et β TC3. Par ailleurs, comme KLF11 était fortement exprimé dans nos échantillons d'îlots et de cellules beta pancréatiques, il devenait un candidat très plausible dans la régulation du promoteur de *INS* au site comprenant la mutation c.-331C>G.
- Des analyses d'immunoprécipitation de chromatine dans des cellules INS1 (le promoteur humain de *INS* est très conservé par rapport au promoteur de rat de *Ins2*) ont montré que KLF11 se fixait bien sur le promoteur endogène de *Ins2* au niveau du site CACCC.
- Des analyses de retard sur gel ont montré que la mutation entraînait une perte de la fixation de KLF11 à la fois sur le promoteur humain de *INS* mais aussi sur celui du rat *Ins2*, qui est très conservé par rapport au promoteur humain.
- Le rôle clef de KLF11 dans la régulation de la biosynthèse insulinaire ici démontré a aussi été appuyé par des études animales. Nous avons en effet montré dans la présente étude, qu'une invalidation du gène *Klf11* chez la souris entraînait

une diminution significative de l'insulinémie à jeun et post-prandiale. Le niveau d'ARNm de *Ins2* chez les souris *Klf11^{-/-}* représentait 66% de celui mesuré chez les souris sauvages. En prenant en compte que d'autres activateurs du promoteur de l'insuline étaient toujours exprimés et actifs chez les souris *Klf11^{-/-}*, cette réduction d'insulinémie définit la contribution quantitative de la fonction de Klf11 dans la biosynthèse de l'insuline. Cependant, nous n'avons noté aucune apparition de diabète chez les souris *Klf11^{-/-}*, ce qui pourrait être dû à une compensation en termes de sensibilité à l'insuline dans les tissus périphériques.

Ces cinq niveaux d'expérimentation fonctionnelle suggèrent que KLF11 régule de façon importante la biosynthèse de l'insuline et sa concentration plasmatique.

Il avait été montré par le laboratoire dans une étude antérieure que des mutations non-synonymes du gène *KLF11* pouvaient entraîner un MODY (171). Nos résultats présents démontrent qu'une altération de la transcription du gène *INS* via la perte de fixation de KLF11 entraîne une autre forme de diabète sévère, le DN. Cet ensemble de données montre un rôle fondamental de KLF11 dans la transcription du gène *INS* et *in fine* dans différents phénotypes de diabète.

Par ailleurs, cette étude montre comment des observations génétiques peuvent aboutir à une meilleure caractérisation de la régulation du promoteur d'un gène.

Enfin, ce travail confirme qu'une mutation à effet très sévère dans une région régulatrice d'un gène peut aussi entraîner une forme de maladie monogénique. L'étiologie génétique des maladies monogéniques ne s'arrête pas en définitive aux parties codantes des gènes, comme cela avait déjà été rapporté dans certaines formes du diabète MODY (mutations des promoteurs *GCK* ou *HNF1A*) (13; 15).

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Mon travail de thèse a contribué à mieux comprendre les déterminants génétiques de la glycémie et du DT2, ainsi que certains des mécanismes impliqués. En effet, mon travail a aidé à :

- ✚ Identifier de nouveaux loci/gènes associés à la glycémie à jeun.
- ✚ Identifier de nouveaux loci/gènes associés à la glycémie-2h et insulinémie-2h.
- ✚ Identifier de nouveaux loci/gènes associés au risque de DT2 en plus de leur impact glycémique.
- ✚ Identifier de nouveaux loci/gènes associés à l'HbA1c.
- ✚ Progresser dans la compréhension des mécanismes d'action de variants à effet faible associés à la glycémie à jeun et d'une mutation à effet très fort dans la survenue d'un DN ; ces différents variants étant situés dans des séquences promotrices des gènes étudiés.

On ne peut en rester à une approche quantitative présentant le nombre de gènes identifiés et la puissance statistique des associations découvertes. Une analyse critique (positive et négative) de ces travaux est indispensable, et conditionne la façon d'envisager les perspectives de recherche qui pourraient en découler.

1/ La puissance des études GWAS dépend clairement de l'effectif des participants impliqués dans l'analyse, car la grande majorité des SNPs communs de susceptibilité aux maladies polygéniques (ou associés aux traits liés à ces maladies), répertoriés jusqu'à présent, ont un effet (très) faible. Centré uniquement sur les traits glycémiques et insulinémiques, le consortium MAGIC apparaît quelque peu comme un « modèle » d'alliance planétaire qui a servi à confirmer avec certitude et aussi à identifier nombre de loci impliqués dans la variabilité des traits du contrôle glycémique, dont un certain nombre contribuant en outre au risque de DT2.

Nous aurions pu penser que le rassemblement d'un grand nombre de cohortes différentes (avec toutefois des origines proches Européennes) engendrerait un bruit de fond délétère dans les signaux d'association, et diminuerait donc l'effet prédit des SNPs sur la variabilité du trait. Au final, concernant *MTNR1B* par exemple, l'effet du SNPs rs10830963 rapporté dans la méta-analyse réalisée par MAGIC était similaire à celui prédit par notre étude GWAS (avec moins de « significativité » certes puisque nous avons analysé un effectif plus faible). Notons que les SNPs montrant une trop grande hétérogénéité inter-cohortes sont de

toute façon écartés des résultats de la méta-analyse. Ce sont donc les mutations les plus anciennes, les mieux distribuées dans l'espèce humaine, qui ont le plus de chance d'être détectées par les grandes méta-analyses. Les autres, par exemple celles qui sont 'spécifiques' d'un groupe ethnique particulier ou du moins rares ne peuvent aisément être détectées par les grandes études de consortium international, ce qui limite la puissance d'analyse des études GWAS qui reposent sur de très larges effectifs pour les loci à très faible effet.

2/ La stratégie de réaliser des études GWAS trait par trait (afin de simplifier l'hypothèse initiale mais aussi pour des raisons pratiques vis-à-vis des cohortes impliquées qui ne sont pas toutes renseignées pour les mêmes phénotypes) a été très fructueuse en terme de résultats. Cependant, aujourd'hui, il manque manifestement une vision d'ensemble au niveau des loci/gènes contribuant à la variabilité des traits glycémiques et insulinémiques, et de leur impact putatif sur la survenue d'un DT2. Par exemple, pourquoi et comment un SNP qui contribue de manière très significative à l'augmentation de la glycémie à jeun n'a aucun impact sur le risque de DT2, alors que l'élévation de ce trait est utilisée dans le diagnostic même du DT2 ?

Etant donné que la plupart des gènes identifiés ont des fonctions encore mal connues, il me semble que nous n'avons pas encore assez exploité les croisements de traits ou indices corrélés au DT2 pour définir des groupes de gènes ayant le même comportement physiologique. A la façon du consortium DIAGRAM+ (dont j'ai montré quelques figures dans la présentation des travaux ; cf **Figures 40 et 41**), il faudrait réaliser des graphiques montrant tous les gènes/loci identifiés par les méta-analyses des études GWAS de traits glycémiques et insulinémiques en plus des gènes de susceptibilité au DT2, selon leurs effets sur les traits ou indices corrélés de près ou de loin au DT2 : allant des indices permettant de mesurer la fonction de la cellule beta et l'insulino-résistance périphérique, aux indices du syndrome métabolique (tous les traits lipidiques par exemple) et des complications du DT2 (pression artérielle, microalbuminurie, créatinine, anémie par exemple). Plusieurs consortia pourraient ainsi s'unir pour dessiner ces croisements. Il est important de noter que ce travail va être amplement facilité d'ici peu grâce aux puces à ADN « *Metabo-Chip* » qui rassemblent plus de 200 000 SNPs associés de près ou de loin aux traits et risque de maladies métaboliques (obésité, DT2, maladies cardiovasculaires...). Vu le faible coût de ces puces (30\$), les effectifs inclus dans ces futures études GWAS seront bien plus importants encore (d'autres cohortes épidémiologiques en dehors de l'aspect génétique jusqu'alors exploré -vu les prix excessifs- pourraient se lancer dans l'aventure) et permettront d'une part d'identifier

des nouveaux loci associés au DT2 (car la puissance statistique sera bien plus élevée encore) mais aussi de mieux comprendre les corrélations entre les gènes et les traits associés afin d'essayer de dessiner des histoires physiologiques. Par exemple, concernant le travail sur l'hexokinase 1 (qui a pourtant une fonction bien connue dans l'engagement du glucose dans la glycolyse) et son association avec l'HbA1c, nous avons pu montrer que le croisement de traits quantitatifs était indispensable afin de ne pas dresser de fausses conclusions physiologiques. « Association » ne signifie pas « causalité » et l'affaire *HK1* démontre bien le danger d'arriver à des conclusions hâtives sans explorer complètement les dessous d'une association « évidente ».

Enfin, je pense qu'il faudrait davantage utiliser, de manière systématique, la puissance des régressions conditionnées afin de rechercher si une association identifiée avec un trait n'est pas simplement le marqueur (ou le reflet) d'une association bien plus forte avec un autre trait. Cet aspect était souvent limité par un manque de puissance statistique. L'utilisation des puces *Metabo-Chips* changera sûrement la donne.

3/ Les études GWAS du DT2 mais aussi des traits glycémiques ont permis d'ouvrir de nouvelles voies d'investigations moléculaires souvent insoupçonnées dans la physiopathologie de la maladie : le transporteur de Zn (codé par *SLC30A8*) ou le récepteur 2 de la mélatonine (codé par *MTNR1B*) en sont de bons exemples.

Toutefois, les SNPs associés qui ont été identifiés par des études GWAS sont pour la plupart localisés dans des régions intergéniques non-conservées. Généralement, les généticiens choisissent de nommer le gène le plus proche mais aucune preuve réelle n'indique que le SNP soit réellement corrélé à ce gène (même s'il a plus de chance de l'être au regard des recombinaisons). Quand le gène le plus proche code une protéine qui a des fonctions connues dans la cellule beta, dans les tissus cibles de l'insuline ou même dans le cerveau (c'est-à-dire dans tous les organes/tissus reliés de près ou de loin à la physiopathologie du DT2), les arguments en faveur du lien entre le SNP et ce gène sont plus forts et les désirs d'investigation moléculaire peuvent s'enclencher. Mais quand la fonction et/ou l'expression de la protéine codée par le gène le plus proche sont complètement floues, les biologistes restent généralement réticents. Avec les dernières études GWAS, c'est le deuxième cas de figure qui a primé. Jusqu'à ce jour, aucune investigation fonctionnelle à haut débit n'a été publiée au regard de l'ensemble de ces découvertes. Pourtant, on pourrait imaginer plusieurs investigations expérimentales qui pourraient amener plus amples arguments sur ce choix (ou non) du gène le plus proche : l'inactivation du gène dans des poissons zèbres (qui constituent

un modèle simple et rapide à expérimenter), l'invalidation du gène utilisant l'interférence par l'ARN dans des lignées de cellules beta (peut-être bientôt humaines) afin par exemple de rechercher si la protéine a un effet direct sur la sécrétion insulinaire (si le gène est exprimé dans les cellules beta)...

Cependant, il a été rapporté par plusieurs études qu'un SNP pouvait réguler l'expression d'un gène localisé bien au-delà sur le chromosome voire sur un chromosome différent (*enhancer* lointain ? impact sur un miRNA ?). Dans l'étude fonctionnelle des deux variants situés dans le promoteur de *G6PC2* (cf Présentation des travaux ; partie III, Article 1), nous avons réalisé une étude eQTL de ces deux SNPs avec l'expression de *G6PC2*. Dans une optique pangénomique et transcriptomique, il serait fortement intéressant de réaliser des puces à ADN d'une centaine d'échantillons d'ADN génomique avec une analyse transcriptomique (par puce à ADN toujours) d'échantillons correspondants de cellules beta triées, d'îlots pancréatiques, de foie, de muscles squelettiques, de tissu adipeux (sous-cutané et viscéral) et si possible de différentes parties cérébrales. Nous pourrions ainsi savoir si chaque SNP identifié jusqu'alors est bien corrélé à l'expression du gène le plus proche ou à un autre gène sur le reste du génome, et dans quel tissu. Ce type d'étude n'a jamais été réellement mis en place à cette échelle car il sous-entend un accès à au moins une centaine de cadavres humains bien phénotypés (âge, sexe, IMC, prise ou non de médicaments anti-diabétiques, heure de la mort de l'individu par exemple) mais aussi une rigueur dans le prélèvement des tissus. Mais je pense qu'une telle étude serait fructueuse en permettant de mieux cibler les gènes en cause. En revanche, elle ne permettrait pas de savoir si le SNP est causal ou non dans l'association rapportée car c'est le bloc haplotypique comprenant le SNP qui serait corrélé à l'expression du gène.

Cette recherche de la causalité d'un SNP reste de la même façon un défi génétique et moléculaire vu les faibles effets identifiés. Les études de *fine-mapping* (c'est-à-dire le séquençage du bloc de recombinaison comprenant le SNP chez un certain nombre d'individus suivi du génotypage des SNPs identifiés chez un plus grand nombre d'individus), afin de rechercher le SNP fonctionnel conduisant l'association, ont très peu abouti jusqu'alors ; ce qui est essentiellement dû à un manque de puissance statistique des modélisations génétiques causé la plupart du temps par des limitations budgétaires (le séquençage d'une large zone par la technique du Sanger est très coûteuse et si beaucoup de variants sont identifiés, le budget devient rapidement exponentiel), puis toujours à la difficulté de confirmer les modélisations génétiques par des expérimentations fonctionnelles peinant à mettre en relief de faibles effets (cf Présentation des travaux ; partie III, Article 1). Les nouvelles approches de séquençage

(génomome entier) pourraient offrir de nouvelles pistes très prometteuses dans cette problématique.

4/ Pour finir, comme je l'ai indiqué à plusieurs reprises tout au long de ce manuscrit, une très faible part de l'héritabilité du DT2 (et donc de la prédiction génétique du DT2) a pu être identifiée par les études GWAS. Il en est de même pour l'héritabilité de la glycémie et l'insulinémie à jeun, de la glycémie-2h, de l'insulinémie-2h et de l'HbA1c. De grandes parts d'ombre demeurent. Plusieurs pistes d'investigation (et donc plusieurs perspectives de recherche) peuvent être soulevées :

- En utilisant encore la stratégie GWAS 'une maladie commune, des variants communs' :

i/ Il serait intéressant de réaliser des études GWAS à partir d'études prospectives qui peuvent amener beaucoup plus de puissance statistique (cf Présentation des travaux, Article 1, avec l'étude de l'association entre *HK1* et l'HbA1c, dans la cohorte D.E.S.I.R. suivie pendant neuf ans), car ces études permettent une accumulation de points de mesure des traits étudiés, tout en gardant une homogénéité dans les méthodes de mesure de ces traits et sans variation de la structure génétique de la population (homogénéité de population).

ii/ Toutes les méta-analyses de GWAS ont été réalisées selon un modèle additif. Il serait intéressant d'analyser les mêmes données selon tous les autres modèles d'héritabilité.

iii/ Les consortia DIAGRAM+ et MAGIC n'ont étudié pour l'heure que des populations Européennes. Dernièrement, d'autres études GWAS du DT2 dans des populations Japonaises ont mis en exergue de nouveaux gènes de susceptibilité au DT2 (dont un signal a été confirmé dans des populations Européennes) (134). Ainsi, vu les structures génétiques différentes d'une population à l'autre, la réalisation d'études GWAS dans des populations non-Européennes est très prometteuse.

iv/ Les interactions entre les signaux d'association (épistasie) et celles entre chaque signal d'association et l'environnement n'ont absolument pas été étudiées pour l'instant dans les grandes méta-analyses de GWAS. D'ailleurs, certaines revues récentes rapportent que la grande part d'ombre de l'héritabilité de l'insulino-résistance se cacherait dans sa forte interaction avec l'environnement (123; 159). Cependant, tout ceci reste à être prouvé car de telles études sont difficiles à mettre en œuvre : l'environnement n'est pas mesuré avec précision par des marqueurs d'exposition qui seraient fiables comme la glycémie à jeun ou l'HbA1c... les traits « environnementaux » (basés en partie sur des questionnaires) diffèrent

fortement d'une cohorte à une autre ; ce qui rend toute grande méta-analyse de GWAS d'interaction gène-environnement quasi-impossible. Or les interactions sont très difficiles à déceler et une certaine puissance statistique est nécessaire. Je pense qu'il va falloir du temps pour mettre en œuvre des protocoles rigoureux afin d'étudier ces interactions.

- Quid des variants rares ?

Dernièrement, David Goldstein a émis l'hypothèse qu'un SNP fréquent contribuant de manière significative à une maladie ou à la variabilité d'un trait ne serait que l'image déformée ou le porte-drapeau d'un grand nombre de mutations rares en fort LD avec ce SNP (D' élevé, r^2 faible) et à effets beaucoup plus forts. Cette hypothèse attractive a été confirmée au moins une fois dans la littérature dans une étude réalisée par l'équipe de John Todd à Cambridge, qui a montré que des variants rares et fonctionnels situés au locus du gène *IFIH1* protégeaient plus fortement en terme d'odds ratio du risque de survenue d'un DT1 que les SNPs fréquents initialement rapportés au même locus par étude GWAS (172). Les nouvelles approches de séquençage haut-débit apportent nombre de pistes expérimentales pour étudier l'impact des variants rares dans la survenue du DT2 (liés ou non aux SNPs fréquents d'ores et déjà répertoriés). Par exemple, on pourrait imaginer (avec un budget certain) que le séquençage du génome entier de 100 cas atteints de DT2 (dont on sait par puces à ADN qu'ils sont par exemple porteurs d'au moins 10 allèles à risque du DT2 communs à tous les cas) versus 100 contrôles normoglycémiques (ajustés à l'âge et porteurs d'aucun des allèles à risque choisis pour les cas) pourrait permettre d'étudier l'existence ou non d'enrichissement de variants rares chez les sujets atteints au niveau des gènes connus de susceptibilité au DT2, mais aussi ailleurs dans le génome (dans des gènes candidats en premier lieu puis ailleurs). De telles observations ouvriraient d'autres perspectives d'investigation (génotypage ou séquençage plus ciblé chez un plus grand nombre d'individus) aboutissant peut-être à l'identification de nouveaux gènes de susceptibilité au DT2. Il y a de fortes chances qu'un tel séquençage engendre des centaines de milliers de mutations par individu. Le plus simple serait d'abord de se focaliser sur les parties codantes puis les parties conservées du génome. Ce ne serait dans tous les cas pas simple à analyser sachant aussi qu'aucun modèle statistique porté sur ces nouvelles problématiques de variants rares (et très nombreux) n'a vraiment été élaboré jusqu'à ce jour.

Au laboratoire, nous avons pensé en premier lieu que cette nouvelle technologie s'adressait parfaitement aux formes monogéniques de DT2. Nous avons séquencé l'exome de plusieurs patients atteints de DN ainsi que de plusieurs sujets au sein de familles montrant un

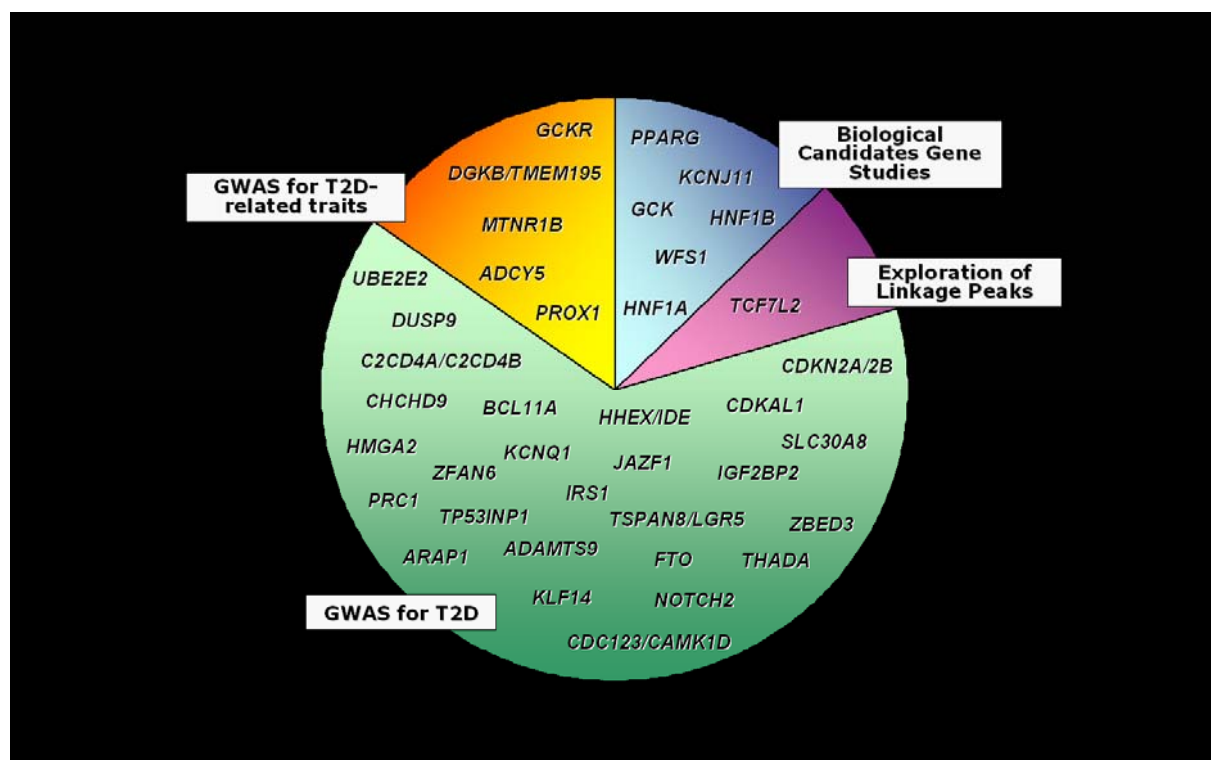
MODY non élucidé. J'ai contribué à une étude que nous venons de publier montrant l'identification d'une mutation dans un gène du DN (*ABCC8*) par séquençage de l'exome entier (SEE) d'un patient, qui n'avait pas été identifiée cinq ans plus tôt par un protocole standard de séquençage (cf Annexe 3). Même si la technique doit encore être améliorée (notamment au niveau de la capture de l'exome), elle est aussi prometteuse dans le diagnostic des maladies rares à étiologies génétiques connues et hétérogènes. Concernant la recherche de mutations causales dans de nouveaux gènes de susceptibilité, tout le challenge se situera dans le filtrage des mutations non causales. De manière instinctive, on peut ressentir déjà le retour de la force des études familiales car le SEE de sujets sains dans ces familles engendrerait d'importants filtrages de mutations non causales. Resterait ensuite à se focaliser sur les mutations communes à tous les sujets atteints...

En bref, cette technique de séquençage du génome ou de l'exome entier ouvre de fabuleuses perspectives de recherche à venir. Le but étant toujours d'identifier de nouvelles étiologies génétiques entraînant des formes mono- et polygéniques de DT2, afin d'une part de mieux connaître les mécanismes physiopathologiques « primaires » de la maladie, mais aussi dans l'espoir d'identifier de meilleures cibles thérapeutiques pour soigner les personnes malades... et pourquoi pas d'établir *in fine* une médecine personnalisée.

Annexe 1.

Loci/gènes de susceptibilité au DT2 commun répertoriés jusqu'à aujourd'hui, selon différentes méthodes employées

(N.B : seuls les loci confirmés ou identifiés par GWAS, après correction de Bonferroni, ont été ici rapportés)



Annexe 2.

“Novel insights into the etiology of diabetes from genome-wide association studies”

(Diabetes. 2009 Nov;58(11):2444-7)

Palmer CN

Annexe 3.

“Molecular diagnosis of neonatal diabetes mellitus using next-generation sequencing of the whole exome”

(PLoS ONE. 2010 Oct)

Bonnefond A, Durand E, Sand O, De Graeve F, Gallina S, Busiah K, Lobbens S, Simon A, Bellanné-Chantelot C, Létourneau L, Scharfmann R, Delplanque J, Sladek R, Polak M, Vaxillaire M, Froguel P.

FIGURES

Figure 1. Prévalences estimées du diabète en 2007 et en 2025 de part le monde

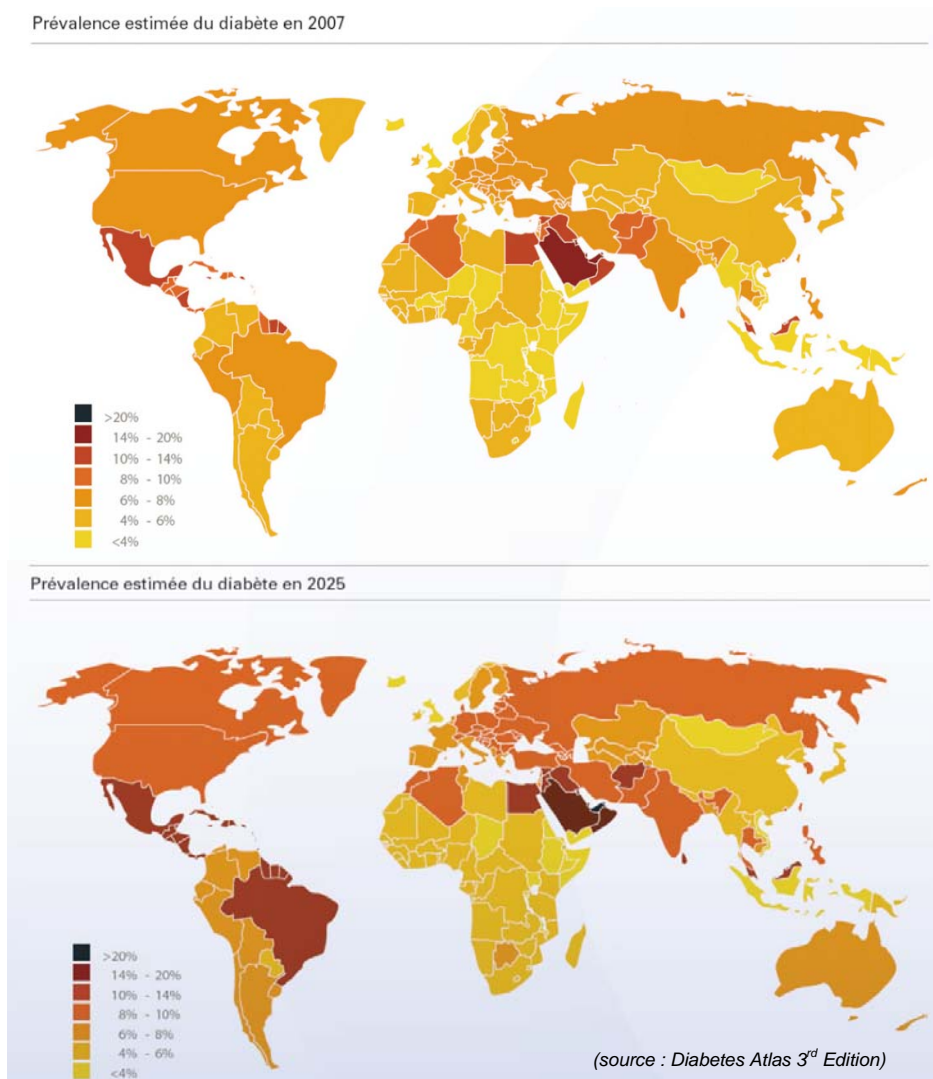


Figure 2. Prévalence du diabète traité selon l'âge et le sexe en 2007, en France

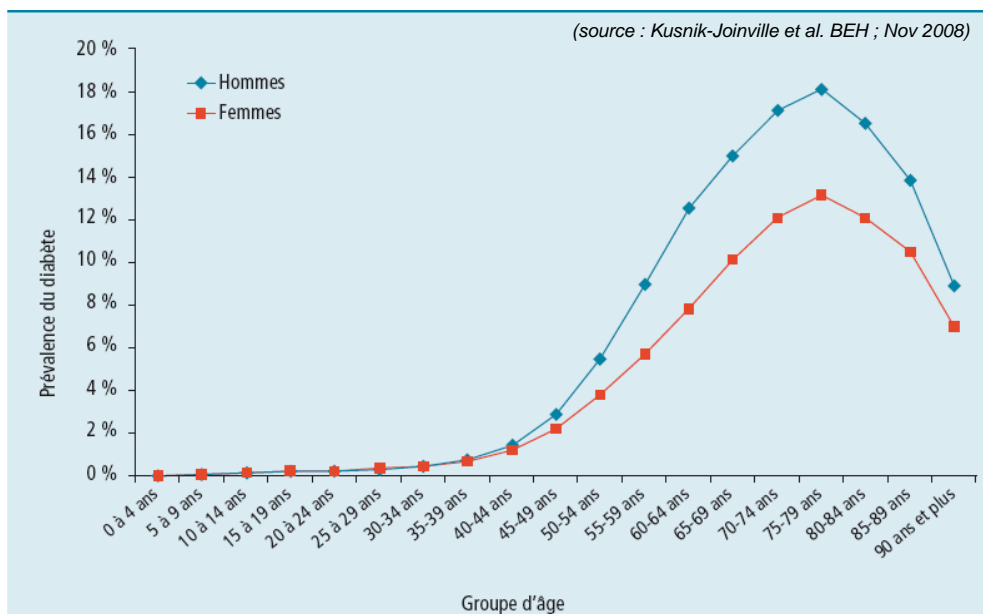


Figure 3. Prévalence du diabète traité par département français, en 2007

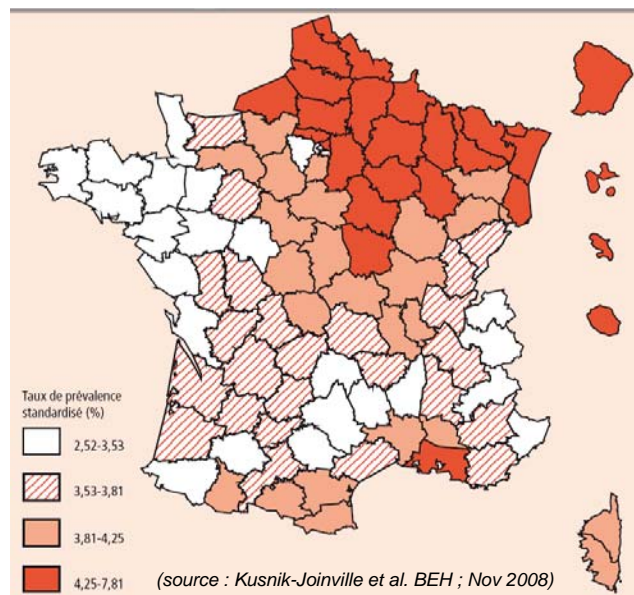


Figure 4. Les complications majeures du diabète

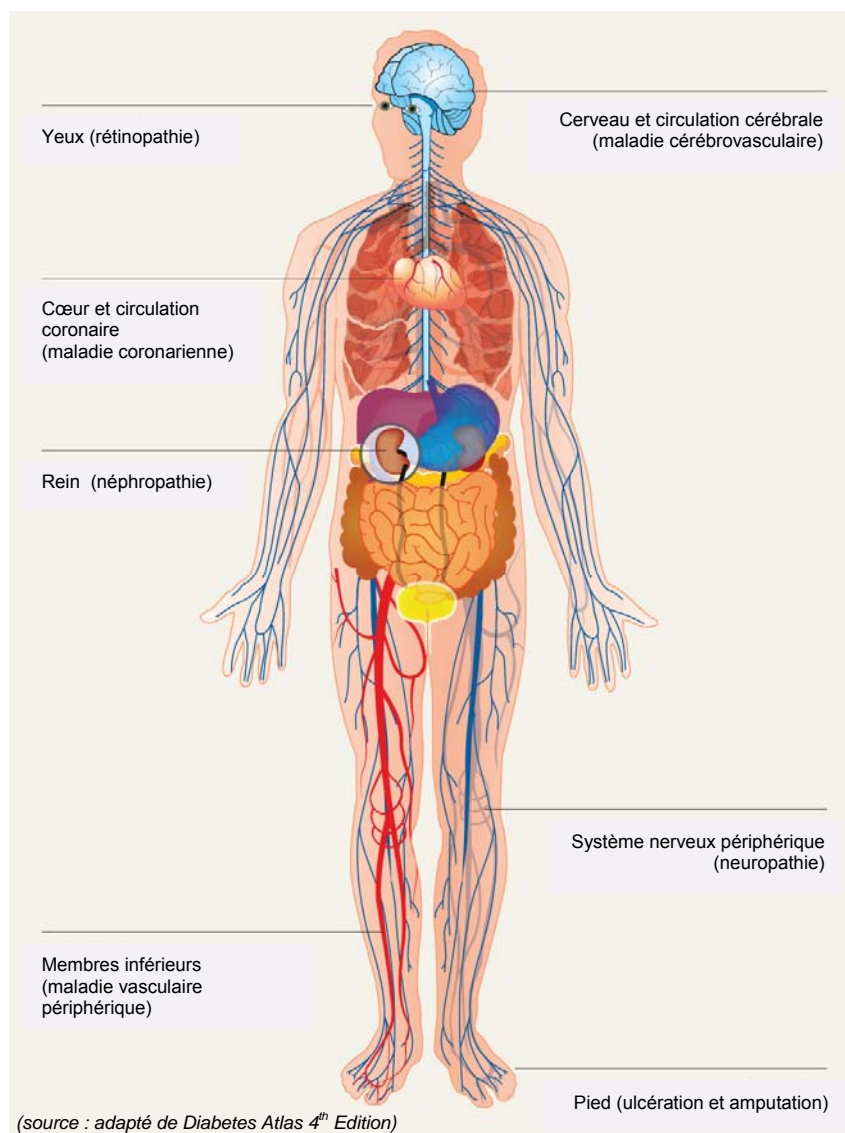


Table 1. Définition des différents états de tolérance et intolérance au glucose d'après les critères de l'ADA (1997) et de l'OMS (1999)

		Glycémie 2h après HGPO en mmol/l (g/dl)		
		< 7,8 (1,40)	7,8 – 11,0 (1,40 – 1,99)	≥ 11,1 (2,00)
Glycémie à jeun en mmol/l (g/dl)	< 6,1 (1,10)	Normal	IGT	Diabète isolé d'après les données à 2h après HGPO
	6,1 – 6,9 (1,10 – 1,25)	IFG	IFG et IGT	
	≥ 7,0 (1,26)	Diabète isolé d'après les données à jeun		Diabète déclaré d'après les données à jeun et à 2h après HGPO

HGPO : hyperglycémie provoquée par voie orale (ingestion de 75g de glucose à jeun)

IFG : hyperglycémie à jeun (ou *impaired fasting glucose* en anglais)

IGT : intolérance au glucose (ou *impaired glucose tolerance* en anglais)

Figure 5. Situation et morphologie des îlots de Langerhans, et photographie d'un îlot humain marqué par immunofluorescence

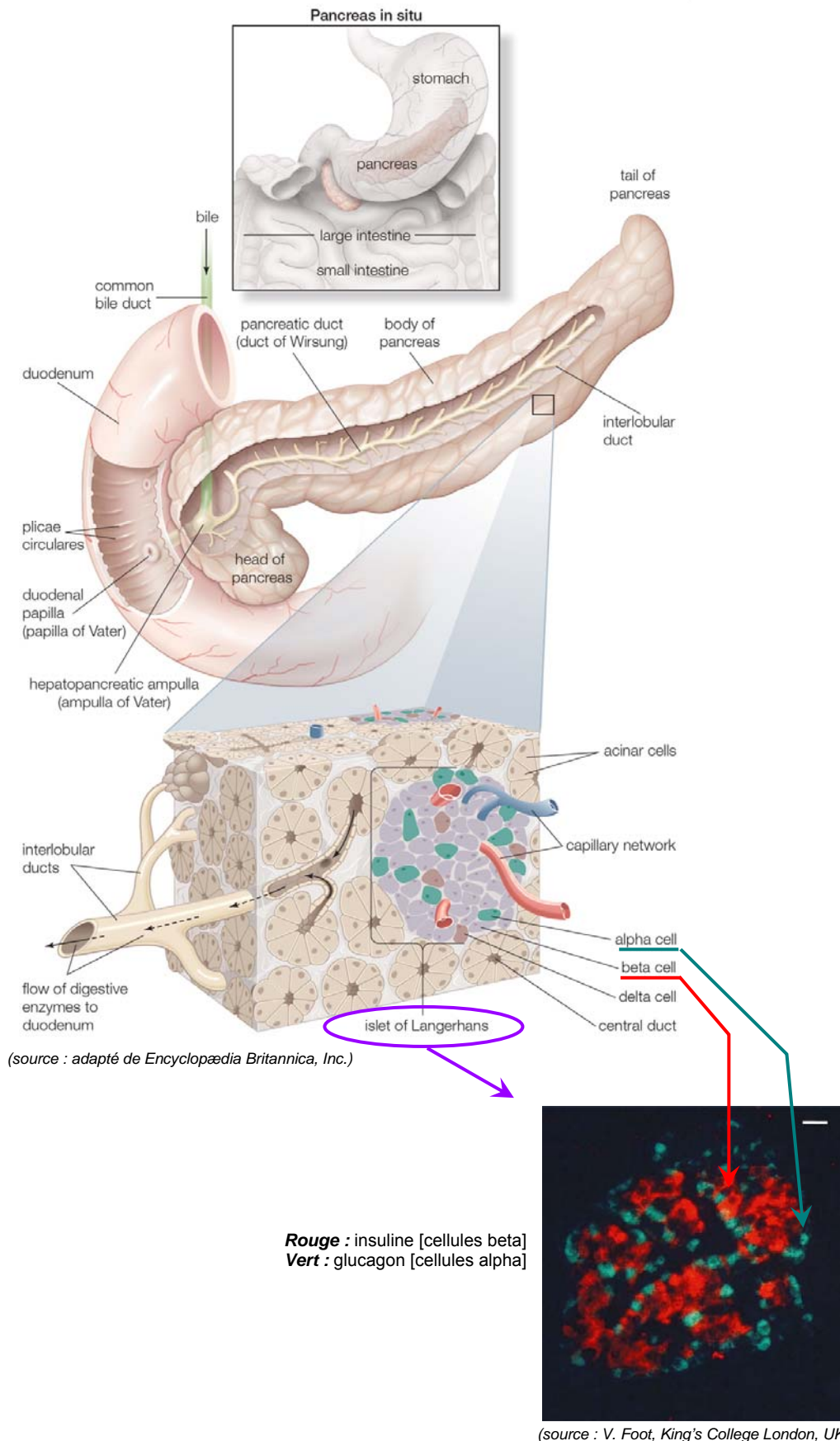


Figure 6. Rôle du système nerveux autonome dans la régulation de la sécrétion insulinaire

VMH : hypothalamus ventromédian
LH : hypothalamus latéral

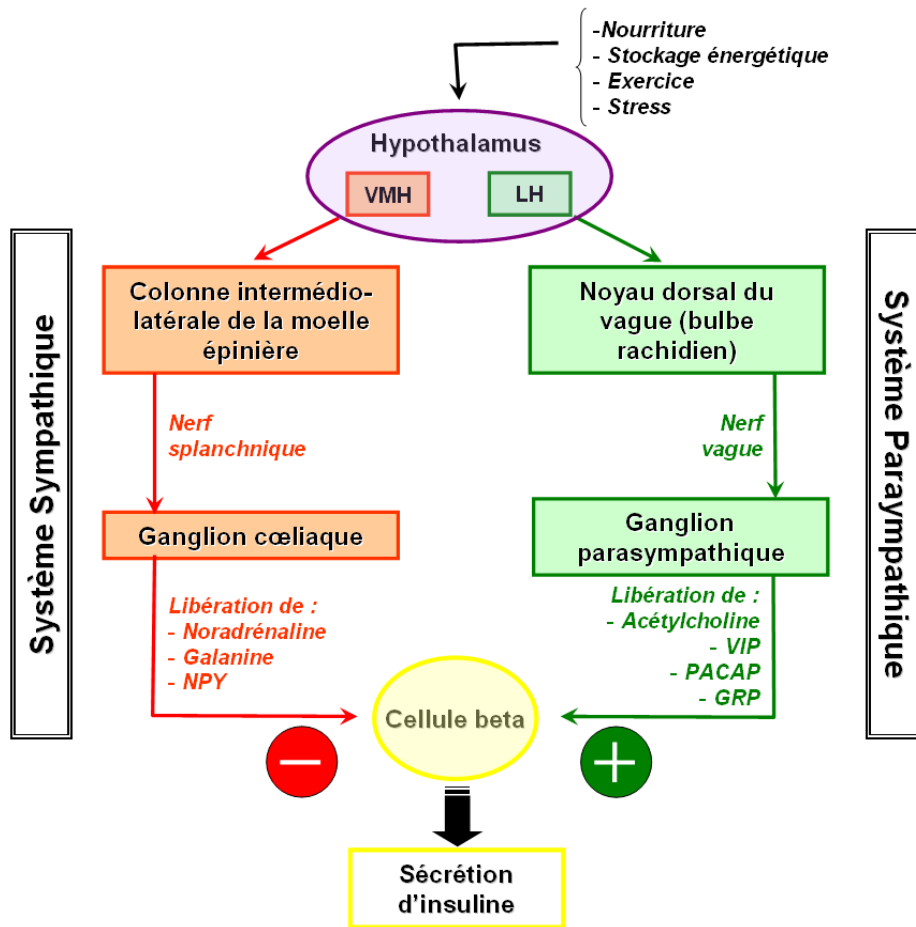
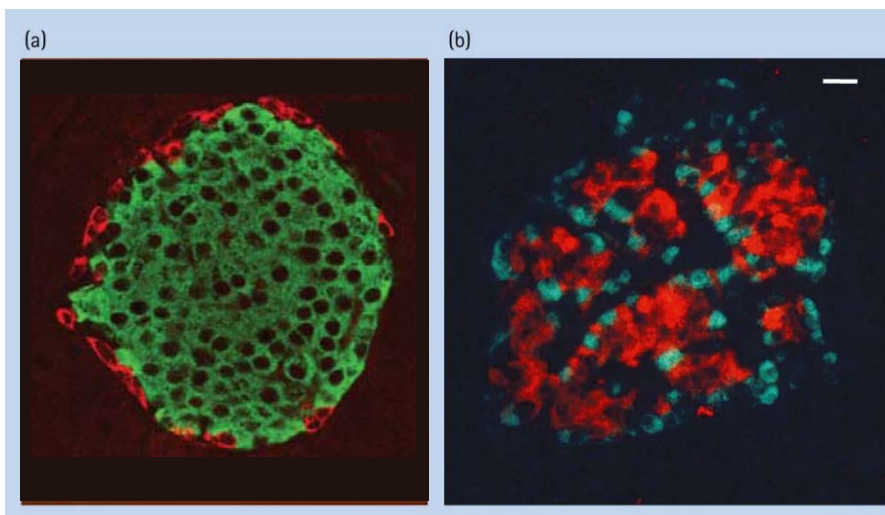


Figure 7. Anatomie des îlots de Langerhans marqués par immunofluorescence (a) chez la souris (b) chez l'homme

Rouge : glucagon [cellules alpha]
Vert : insuline [cellules beta]

Rouge : insuline [cellules beta]
Vert : glucagon [cellules alpha]

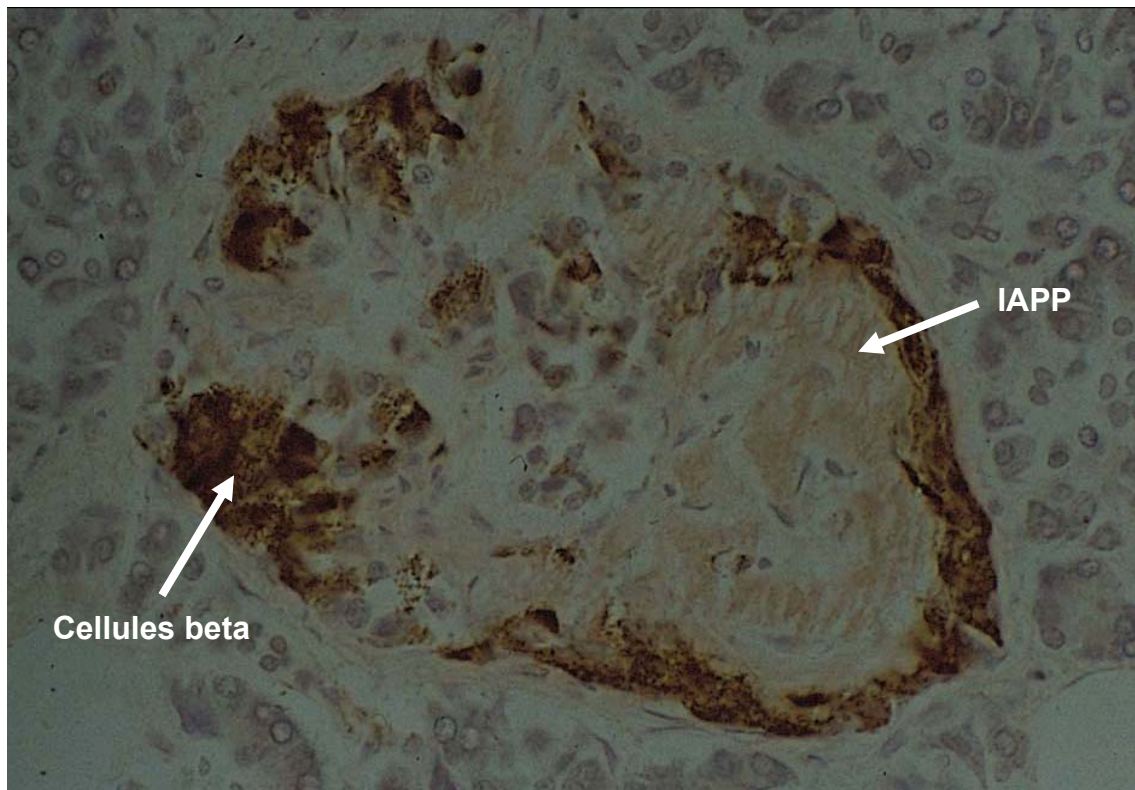


(source : Hans Clevers, Hubrecht Institute, les Pays-Bas (a); V. Foot, King's College London, UK (b))

Figure 8. Dépôt amyloïde d'un îlot de Langerhans chez un patient atteint de DT2

Polypeptides IAPP : colorés en rose pâle en utilisant du rouge Congo

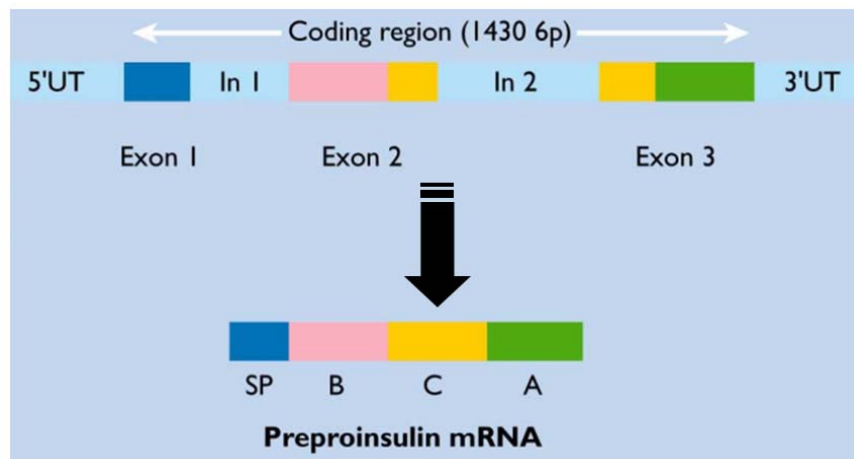
Insuline (contenue dans les cellules beta) : marquée en marron en utilisant de l'immunopéroxydase



(source : adapté de Alsahi et al. *Textbook of Diabetes 4th Edition*)

- Le dépôt amyloïde occupe plus de 50% de l'îlot et se situe principalement en son centre. Les cellules beta sont relayées en périphérie de l'îlot et leur nombre est très diminué.

Figure 9. Structure du gène de l'insuline chez l'homme

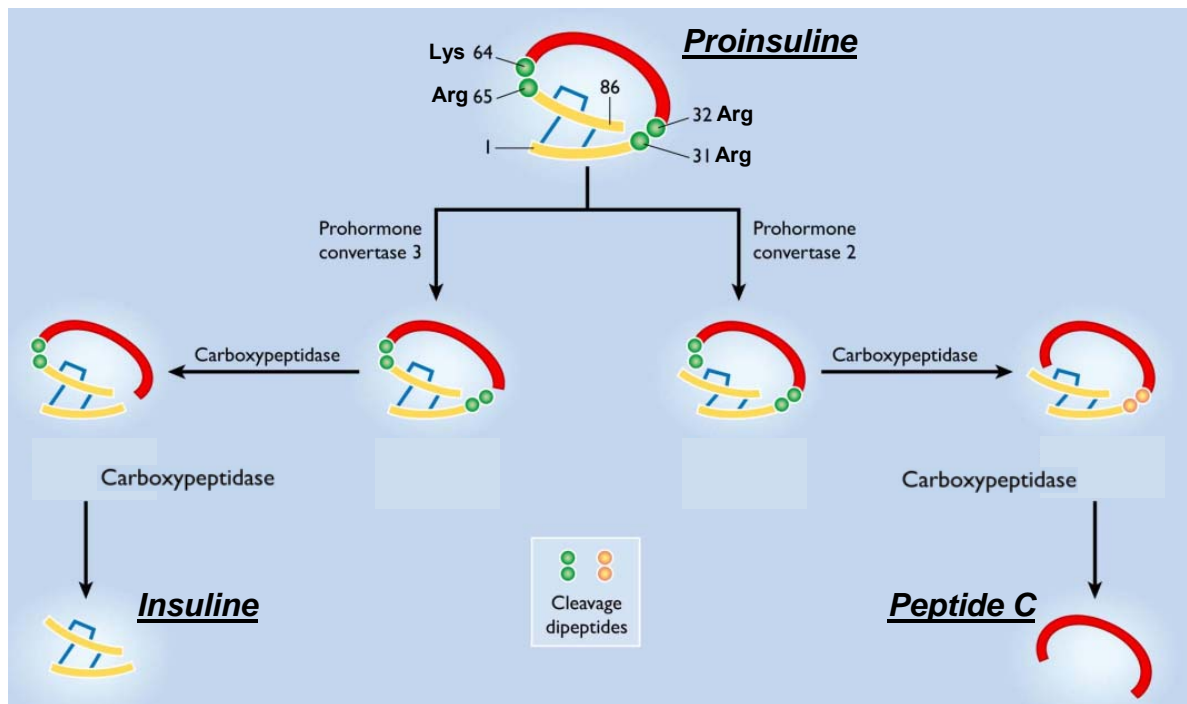


5'- and 3'UT : régions 5' et 3' non traduites
In : Intron

Table 2. Synthèse d'insuline et transport intra-cellule beta

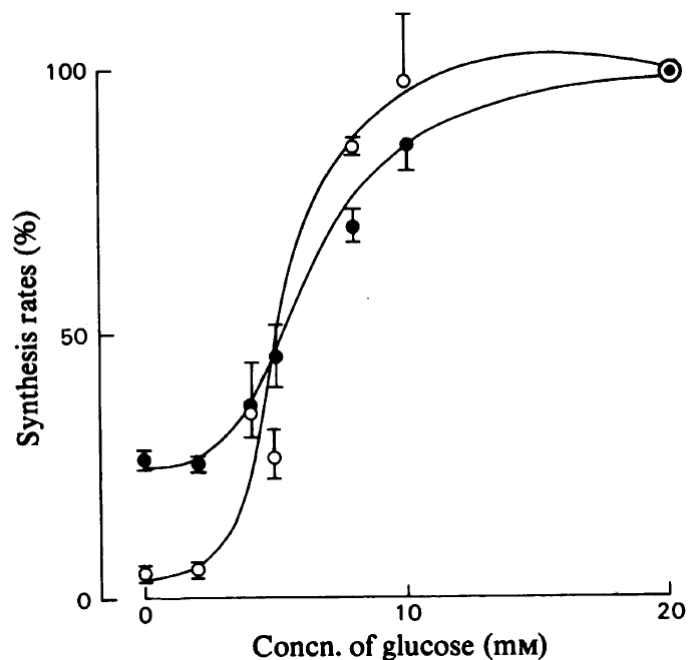
Étapes moléculaires	Évènements cellulaires	Organelles
Réduction de préproinsuline déroulée.	Synthèse de préproinsuline et clivage en proinsuline.	Réticulum endoplasmique
Formation de ponts disulfures.	(de 10 à 20 minutes)	
Formation d'hexamères Zn-Proinsuline.	Transfert.	Microvésicules
Formation d'hexamères Zn-Insuline avec libération de peptide C.	Début de la conversion de la proinsuline.	Cis-Golgi
Début de la précipitation.	Fin de la conversion de la proinsuline.	Appareil de Golgi
Formation des cristaux.	(de 30 à 120 minutes)	Trans-Golgi
	Stockage.	Granules de sécrétion précoces
	(de quelques heures à quelques jours)	Granules de sécrétion matures
	Libération des vésicules par exocytose.	

Figure 10. Maturation de l'insuline dans la cellule beta



(source : adapté de Jones et al. *Textbook of Diabetes 4th Edition*)

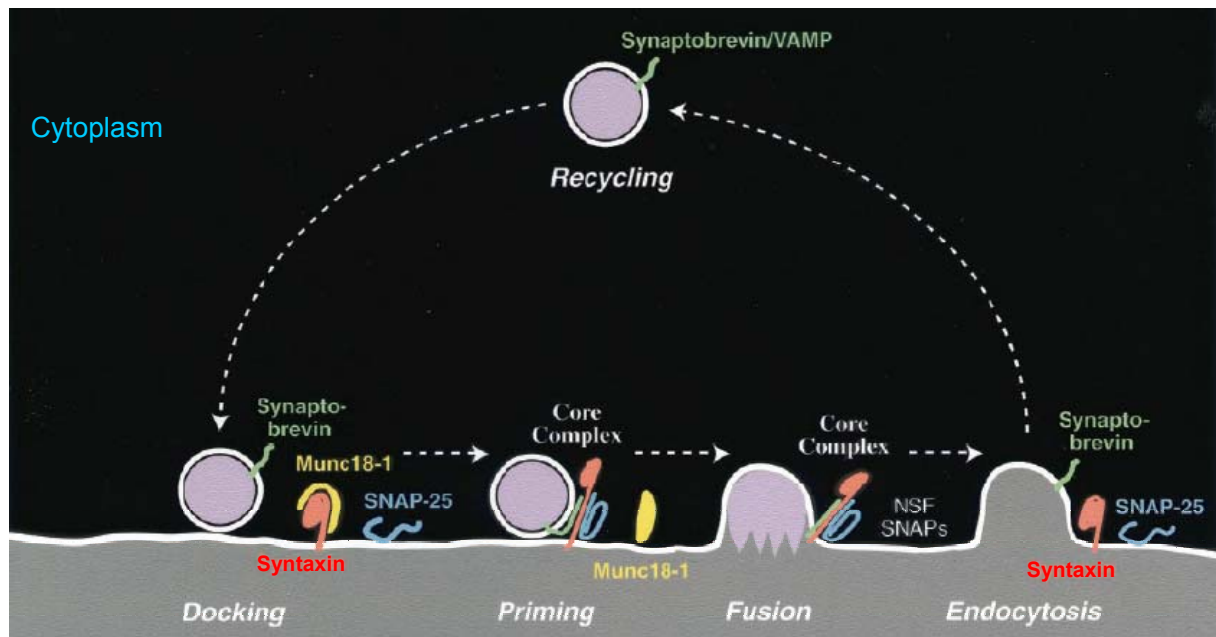
Figure 11. Relation sigmoïdale entre la glycémie et la biosynthèse d'insuline



Biosynthèses de proinsuline (o) et de toutes les protéines (●) en fonction de la concentration de glucose dans des îlots de Langerhans issus de rat

(Source : Stephen J.H. Ashcroft et al. *Biochem. J.* ; Feb 1978)

Figure 12. Rôle des protéines SNARE pendant l'exocytose des granules d'insuline

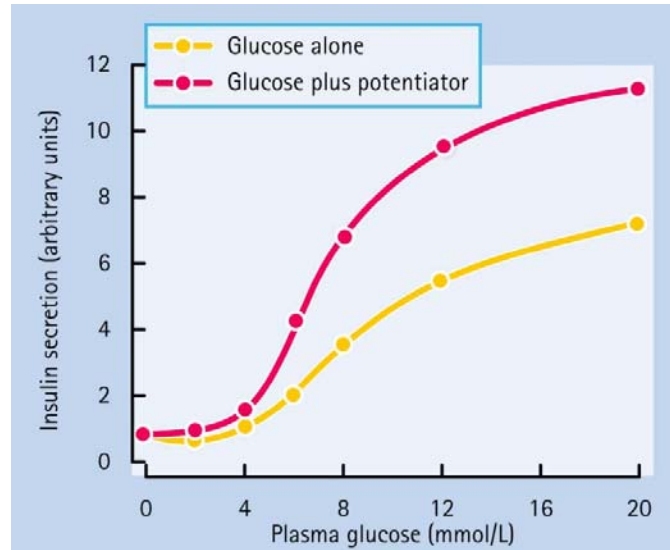


(Source : Gerber and Südhof. Diabetes ; Feb 2002)

Figure 13. Sécrétion insulínique par les îlots de Langerhans, selon différentes concentrations de glucose

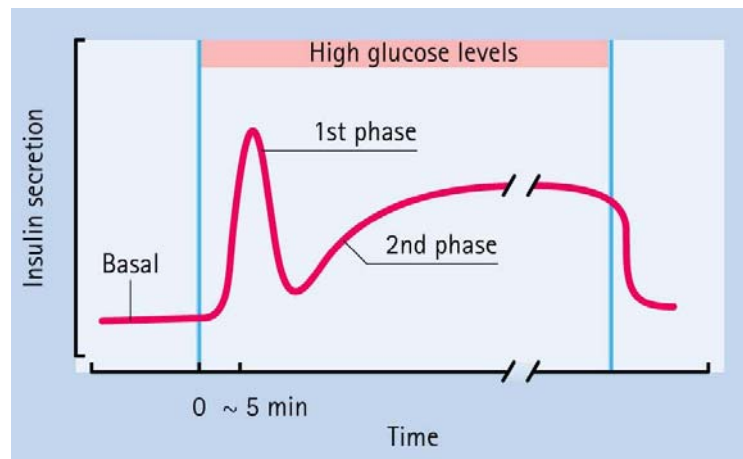
→ Aucune stimulation n'est observée sous un seuil de glycémie équivalent à 5mmol/l

→ Les potentialisateurs amplifient la sécrétion d'insuline à des concentrations au-delà du seuil de glycémie de 5mmol/l mais sont complètement inefficaces en deçà.



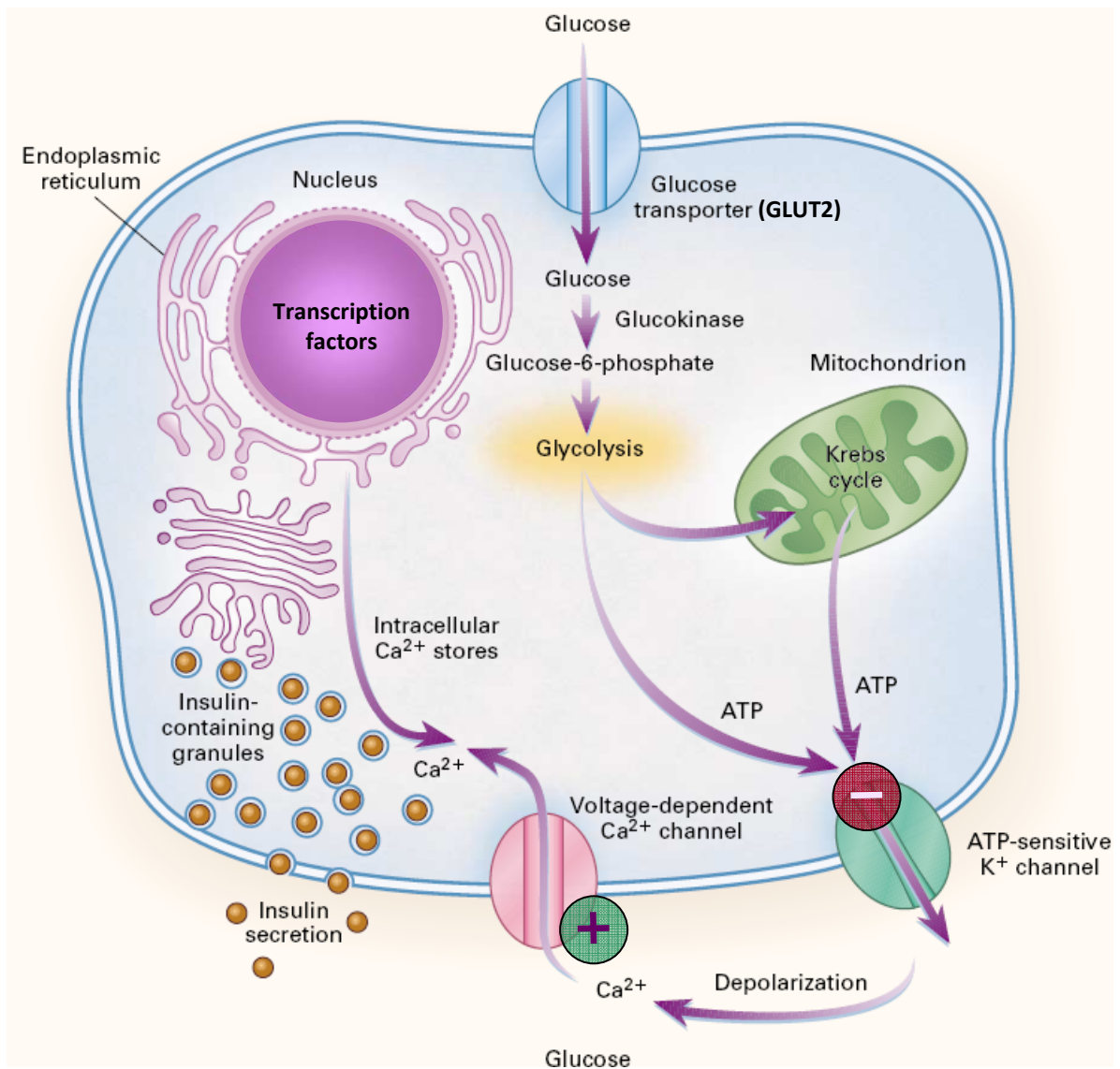
(source : Jones et al. Textbook of Diabetes 4th Edition)

Figure 14. Sécrétion insulínique induite *in vitro* par une concentration élevée de glucose



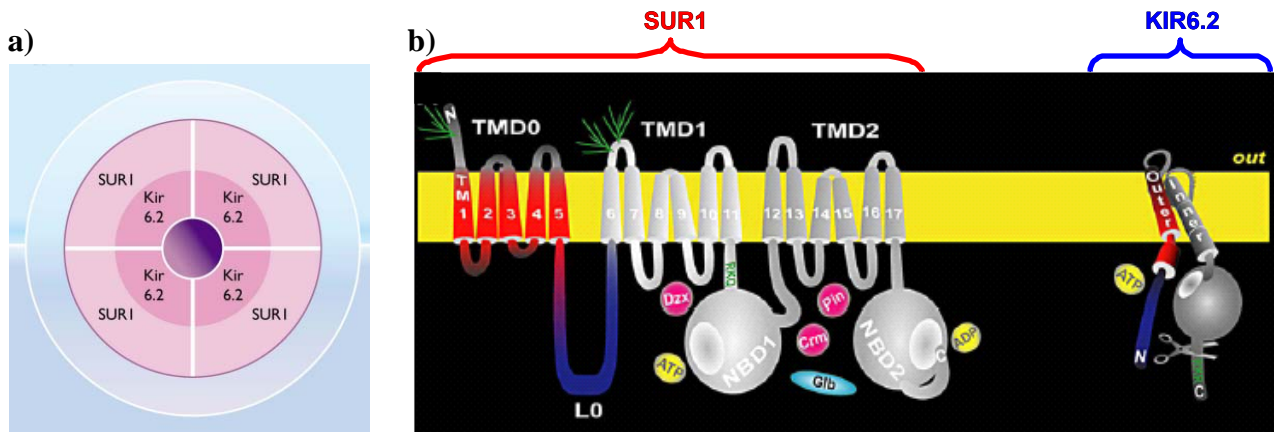
(source : Jones et al. Textbook of Diabetes 4th Edition)

Figure 15. Modèle de fonctionnement de la cellule beta pancréatique



(source : adapté de Fajans et al. NEJM ; Sept 2001)

Figure 16. Modélisation des canaux K⁺-ATP : a) Organisation du complexe octamérique exprimé dans la cellule beta; b) Topologie intra-membranaire des deux sous-unités du canal



(source : Babenko. J Mol Cell Cardiol ; Juillet 2005)

Figure 17. Effets de l'élévation d'ions Ca^{2+} induite par le glucose sur l'adénylate cyclase dans la cellule beta

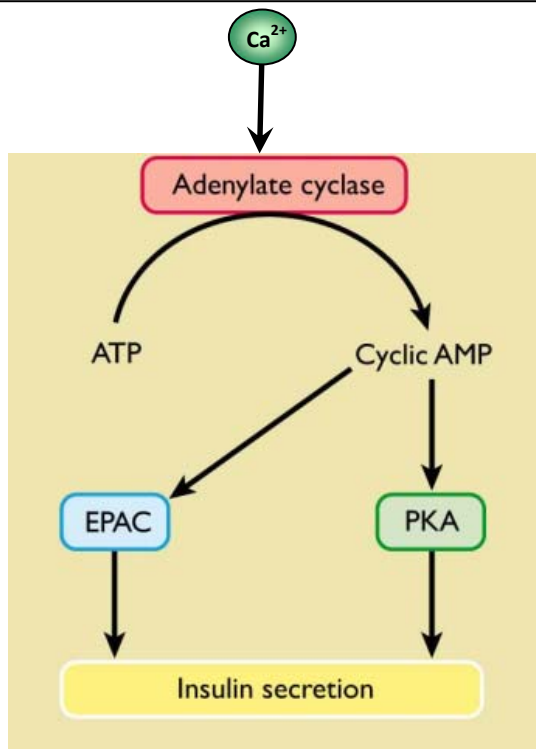
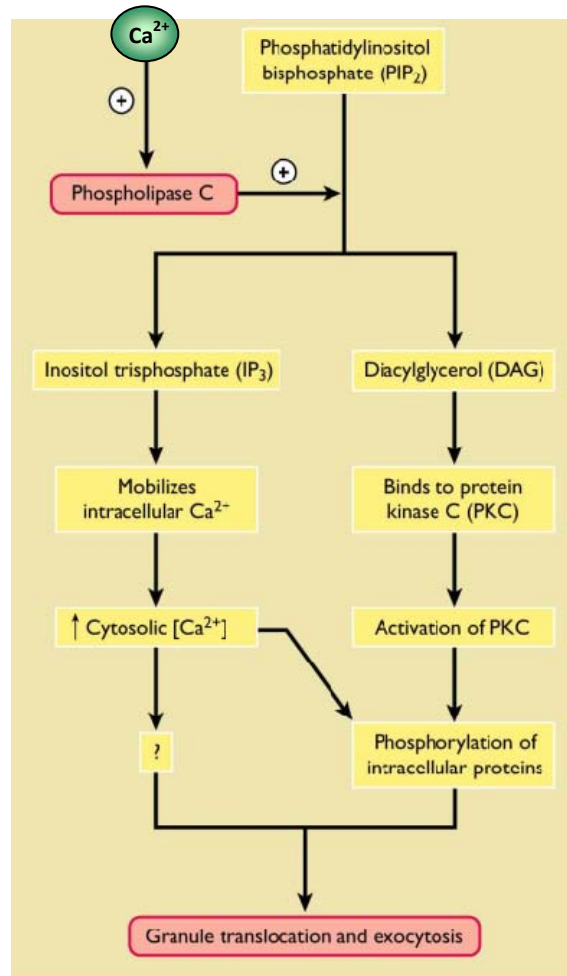


Figure 18. Effets de l'élévation d'ions Ca^{2+} induite par le glucose sur la phospholipase C dans la cellule beta



(source : adapté de Jones et al. Textbook of Diabetes 4th Edition)

Figure 19. Effets du glucagon et de la somatostatine sur l'adénylate cyclase dans la cellule beta via les protéine G_s et G_i respectivement

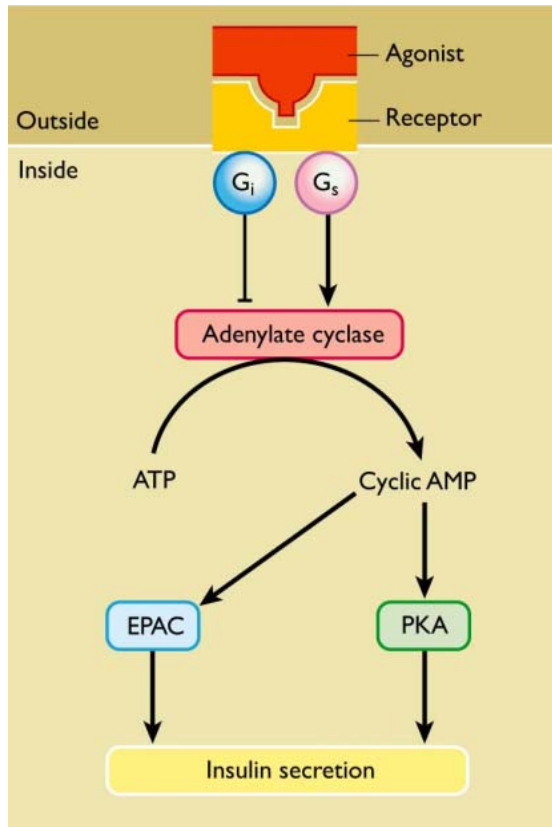
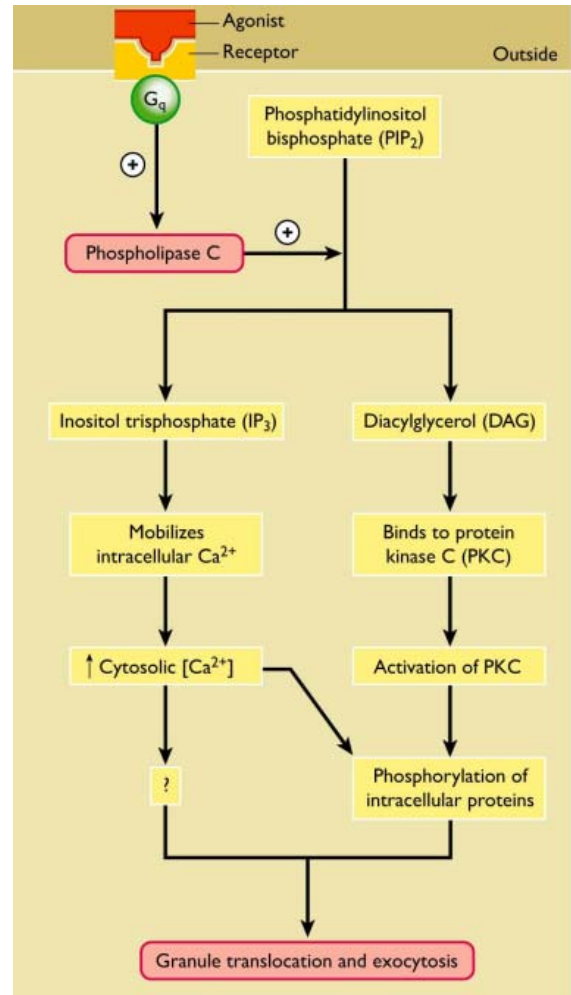


Figure 20. Effets de l'acétylcholine sur la phospholipase C dans la cellule beta

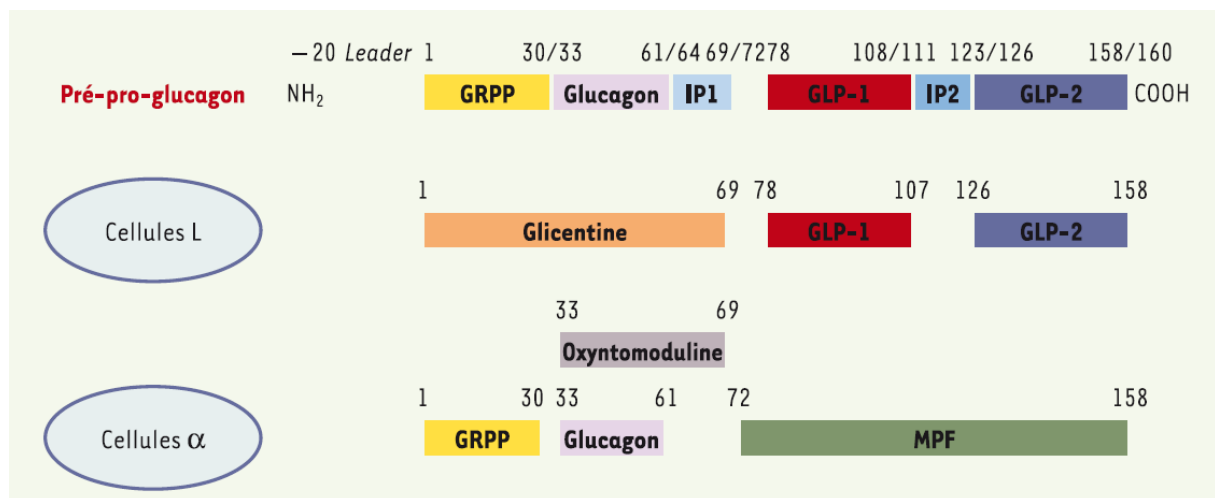


(source : adapté de Jones et al. Textbook of Diabetes 4th Edition)

Figure 21. Mécanisme de formation du GLP-1

→ La molécule de pré-pro-glucagon est exprimée dans les cellules L de l'intestin et les cellules α du pancréas endocrine.

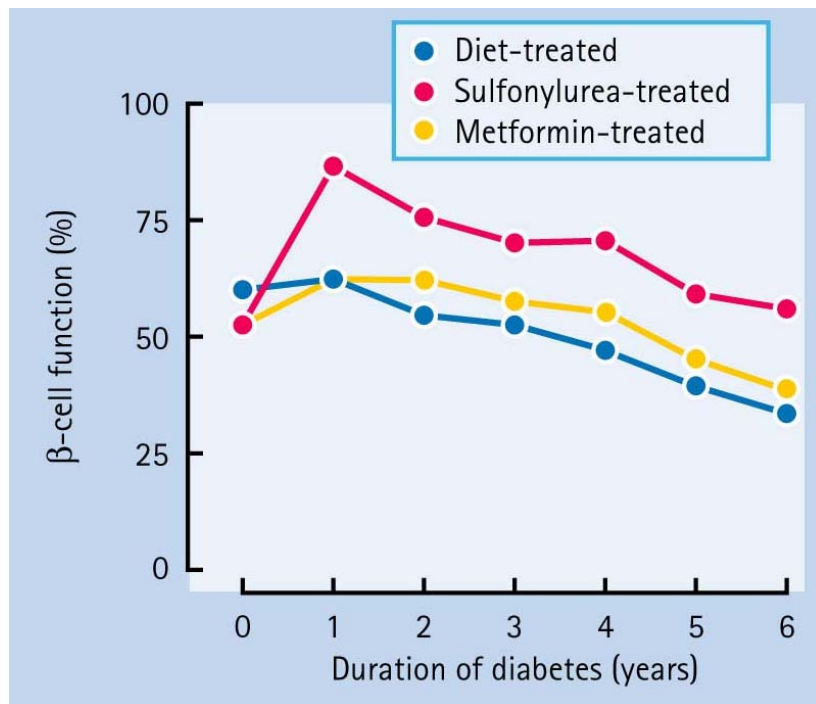
→ Des mécanismes de clivage protéolytique différentiels conduisent, dans les deux types cellulaires, à la production de peptides dont l'activité biologique est différente. Dans les cellules intestinales, le pro-glucagon est clivé pour produire la glicentine et l'oxyntomoduline, dont les rôles physiologiques, aux concentrations circulantes normalement observées, ne sont pas encore identifiés. Le GLP-1, qui peut être sous forme amidée (appelé GLP-1(7-37) ou GLP-1(7-36)amide), et le GLP-2 sont les deux principaux peptides biologiquement actifs. Dans les cellules α du pancréas, le GLP-1 et GLP-2 ne sont pas produits, ou seulement en quantités relativement très faibles, le glucagon étant alors le peptide biologique actif le plus abondant.



GRPP: glicentin related polypeptide; **MPF:** major proglucagon derived peptide; **IP2:** intervening peptide 2
(source : Thorens. Medecine/Sciences ; Août 2003)

Figure 22. Dégradation de la fonction de la cellule beta lors d'un DT2, selon les traitements

-> La fonction de la cellule beta est d'ores et déjà réduite de 50% lors de la déclaration du DT2

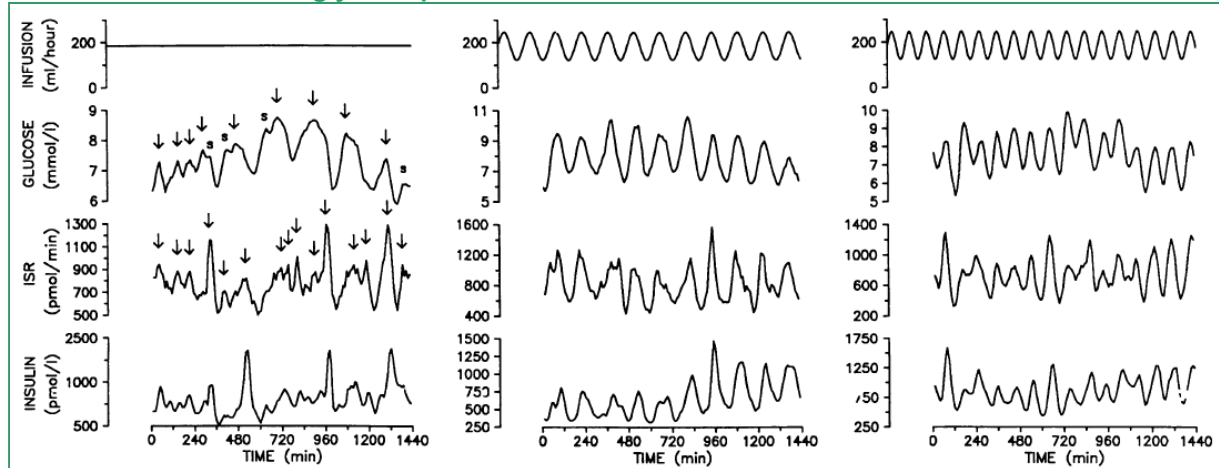


(source : Alsaïli et al. Textbook of Diabetes 4th Edition)

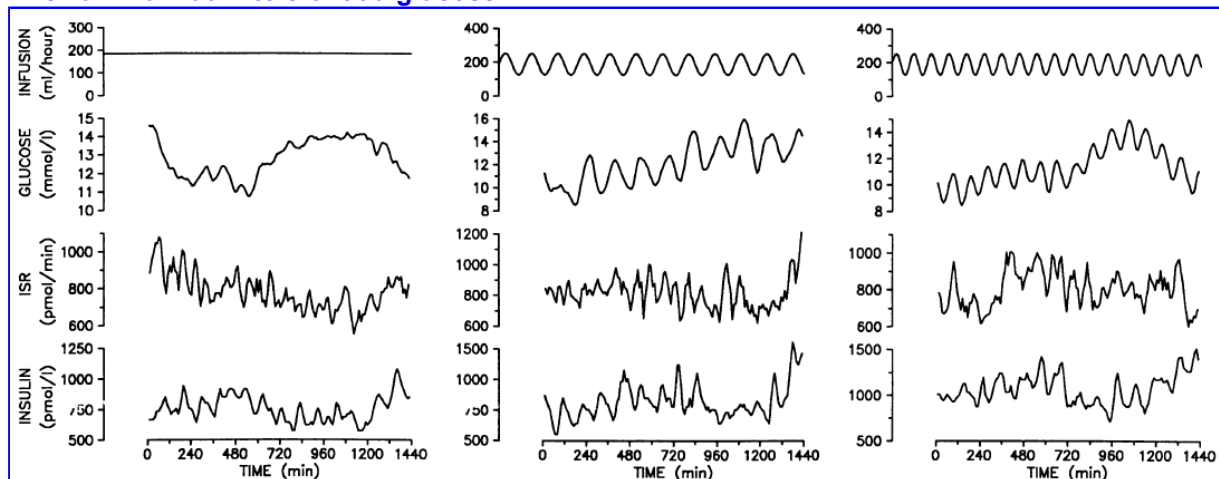
Figure 23. Profils des concentrations de glucose et d'insuline, et de la vitesse de sécrétion d'insuline (ISR pour *insulin secretion rate*), en fonction des injections de glucose chez trois sujets

→ Les trois études réalisées sur chaque patient sont montrées : injection constante de glucose à gauche, injection selon des oscillations lentes au milieu, injection selon des oscillations rapides à droite. Les pics significatifs sont montrés par une flèche dans les profils du glucose et de l'ISR, durant l'injection constante de glucose.

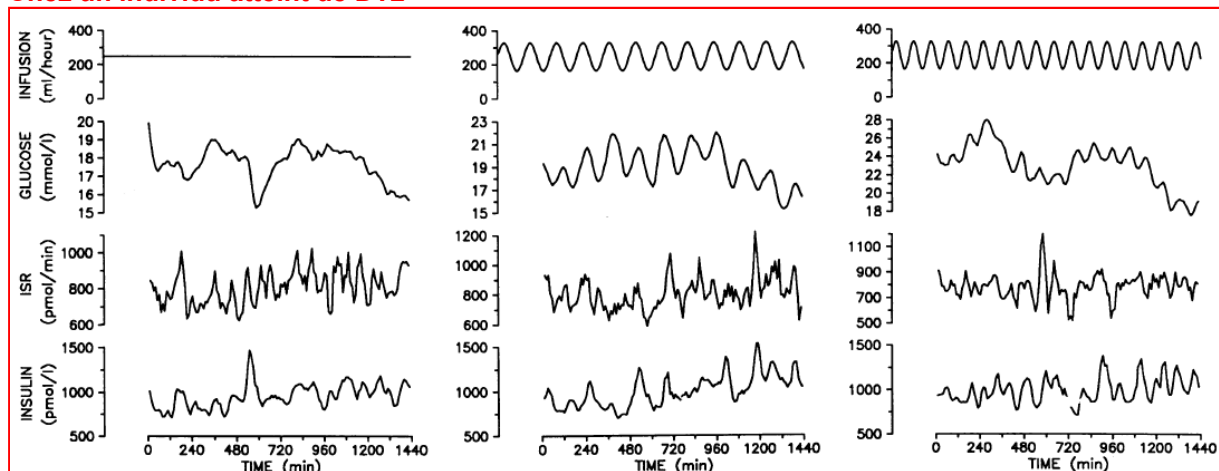
Chez un individu normoglycémique



Chez un individu intolérant au glucose



Chez un individu atteint de DT2



(source : O'Meara et al. JCI ; Juillet 1993)

Figure 24. Modélisation du récepteur de l'insuline

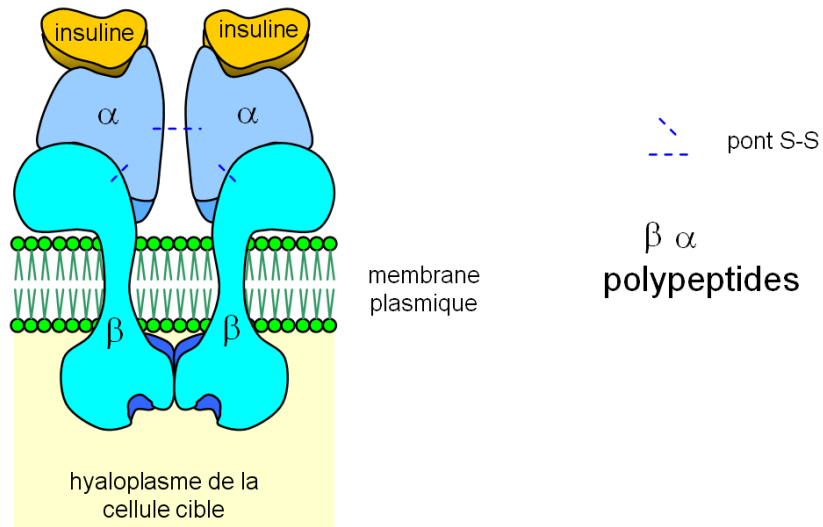
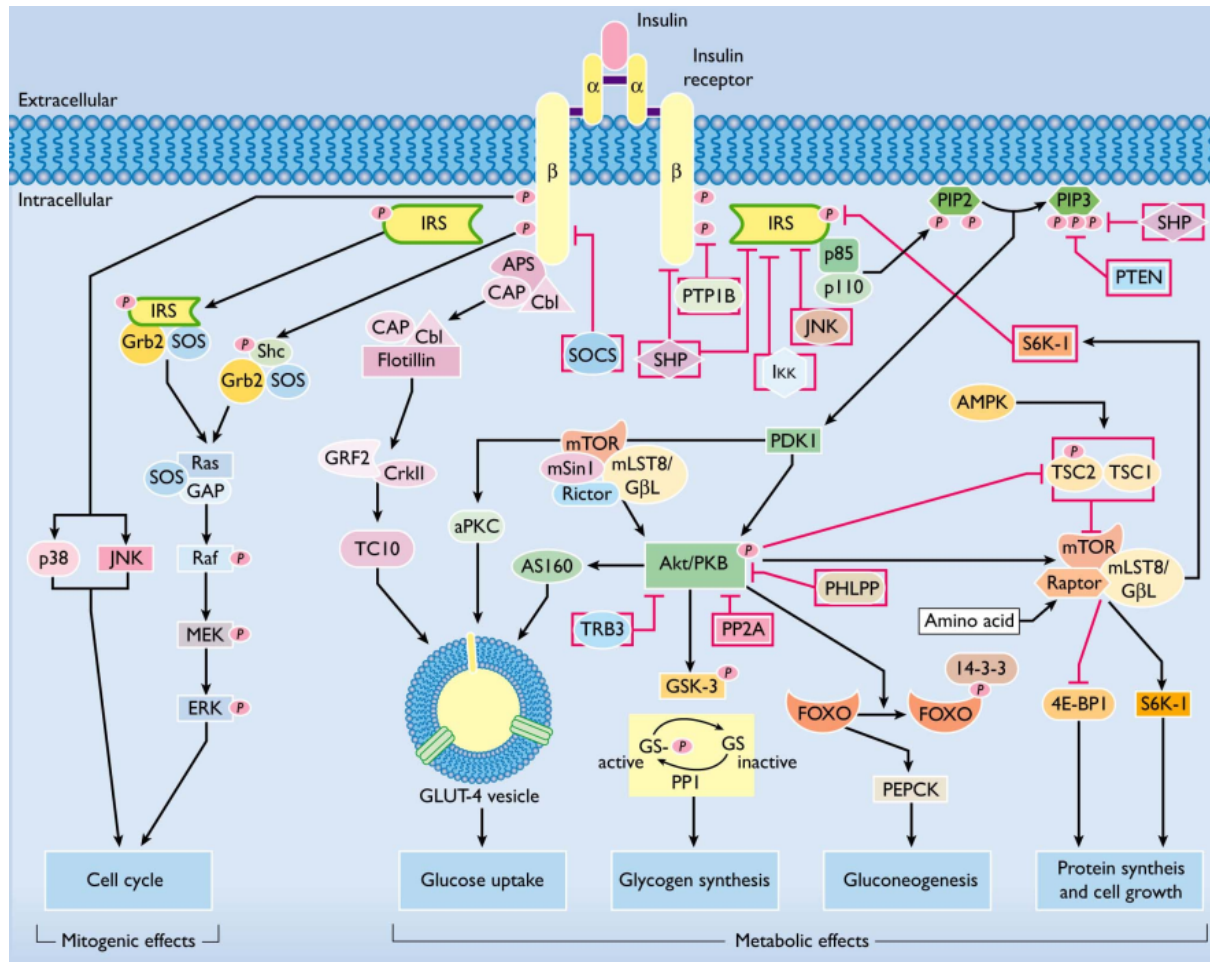


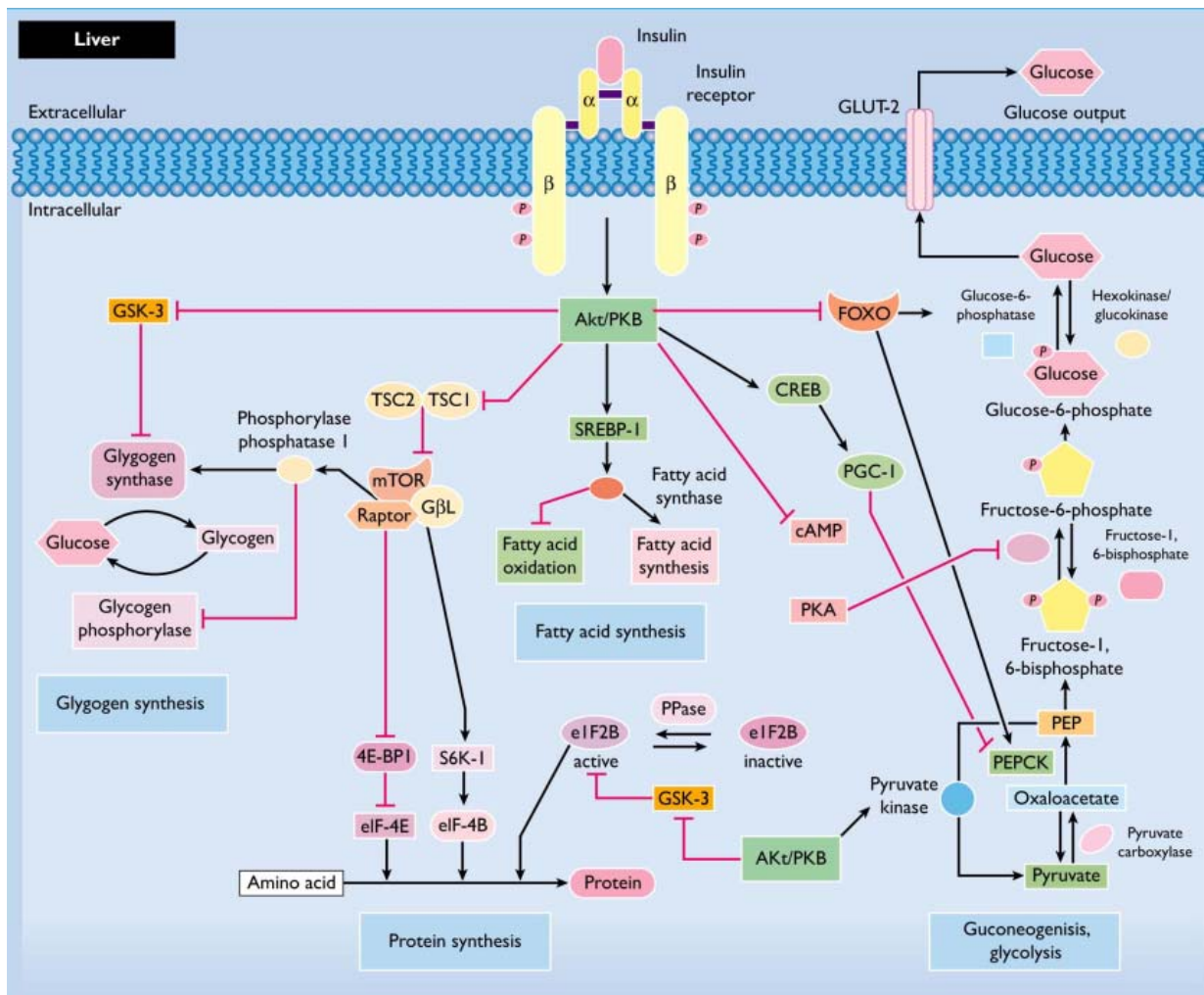
Figure 25. Illustration des voies de signalisation insuliniques impliquées dans les effets métaboliques et mitogènes

→ Les flèches représentent des activations alors que les flèches bloquées représentent une inhibition.



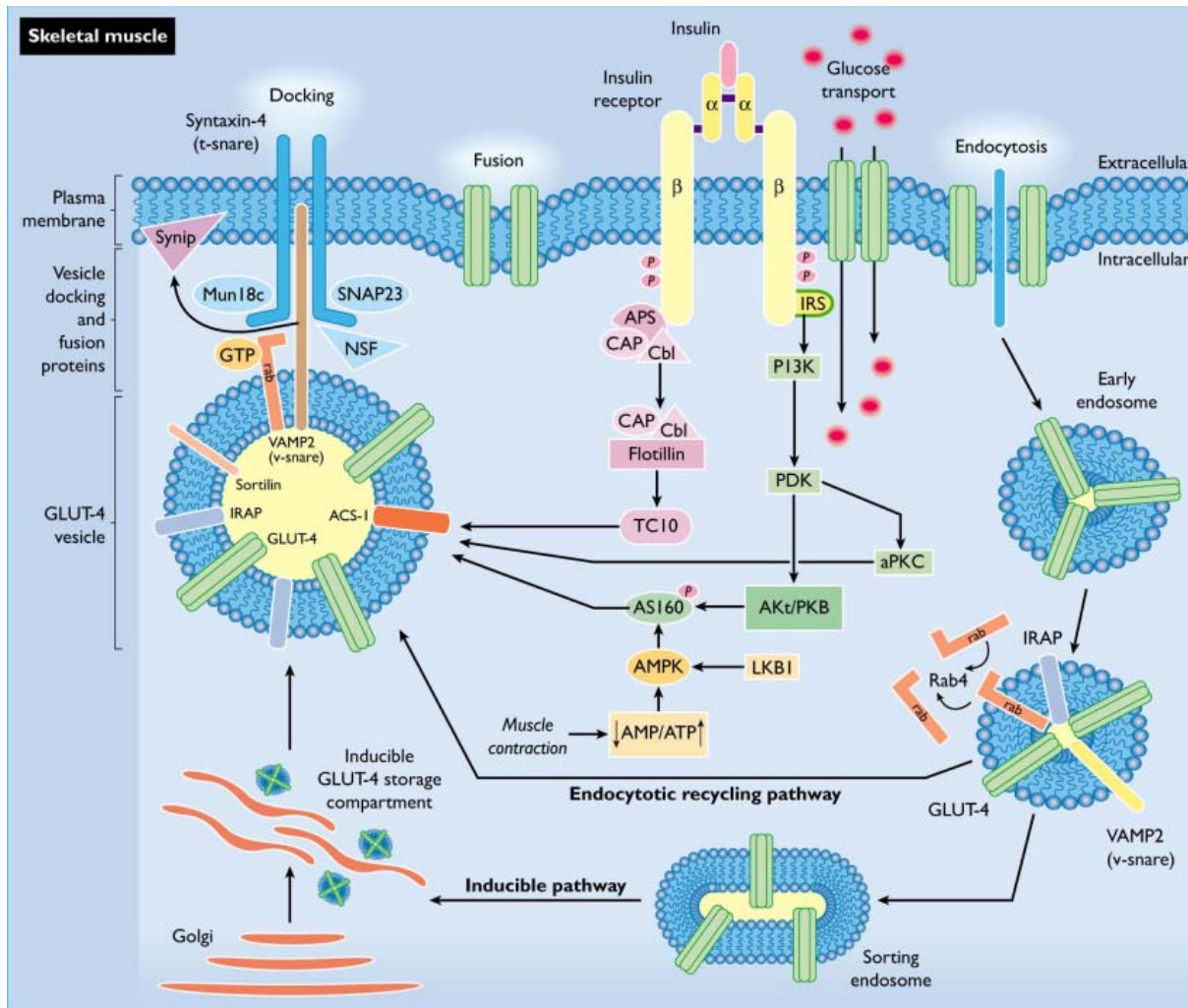
(source : Wu et al. Textbook of Diabetes 4th Edition)

Figure 26. Illustration des voies de signalisation insuliniques impliquées dans le foie



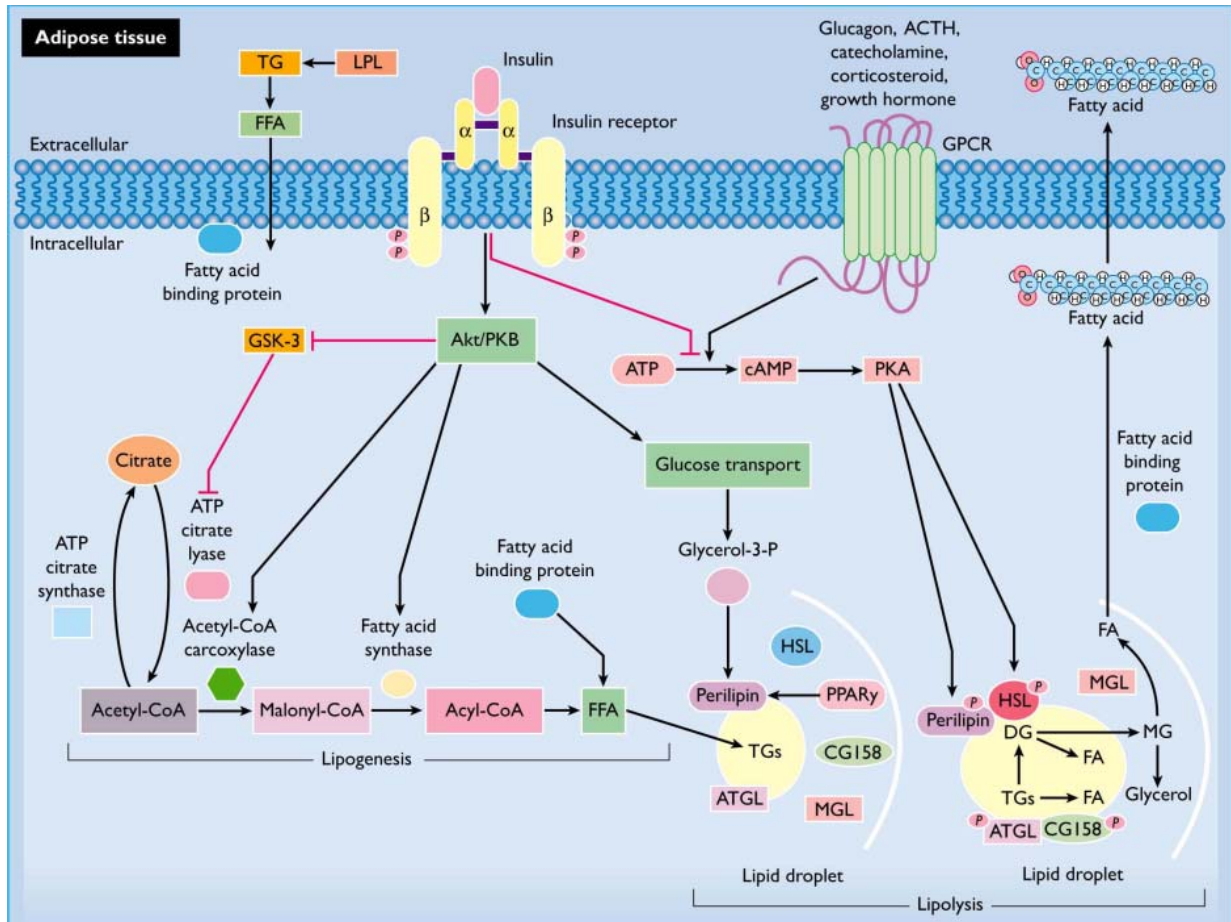
(source : Wu et al. Textbook of Diabetes 4th Edition)

Figure 27. Illustration des voies de signalisation insuliniqes impliquées dans le muscle squelettique



(source : Wu et al. Textbook of Diabetes 4th Edition)

Figure 28. Illustration des voies de signalisation insuliniques impliquées dans le tissu adipeux



(source : Wu et al. Textbook of Diabetes 4th Edition)

Figure 29. Début d'un article paru dans le Lancet en 1962

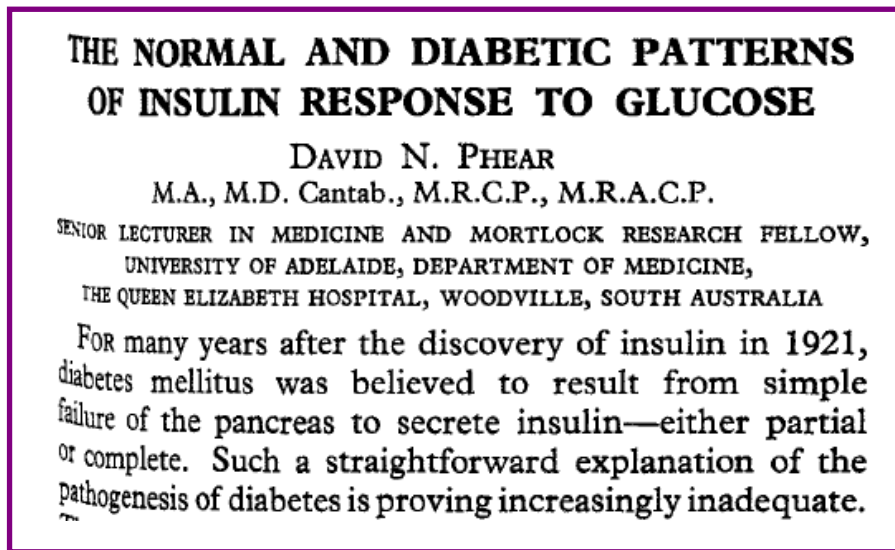
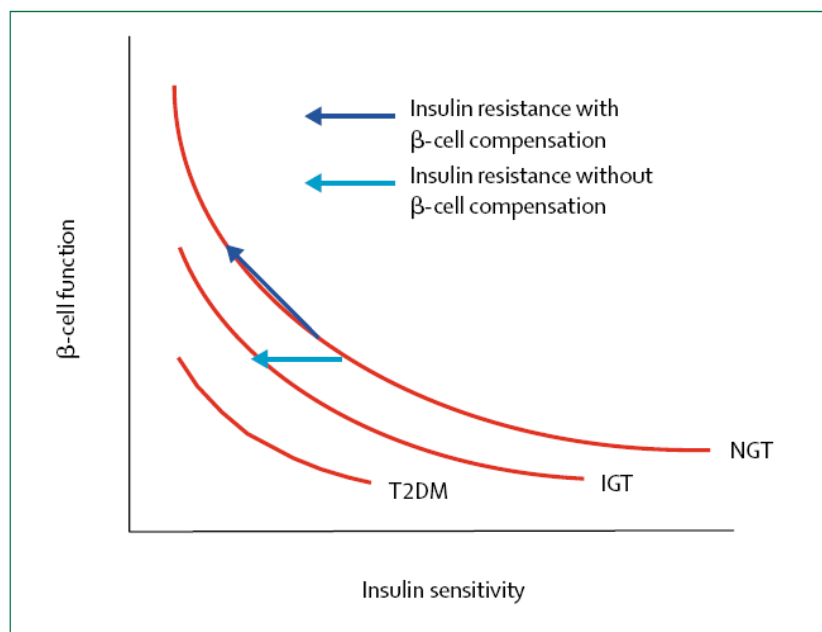


Figure 30. Relation hyperbolique entre la fonction de la cellule beta et la sensibilité à l'insuline



NGT: sujets normoglycémiques ; **IGT:** sujets intolérants au glucose ; **T2DM:** sujets atteints de DT2
(source : Stumvoll et al. Lancet ; Avril 2005)

Figure 31. Représentation schématique de la cellule beta, illustrant les conséquences des mutations au sein des gènes *ABCC8* et *KCNJ11* dans la sécrétion insulinaire

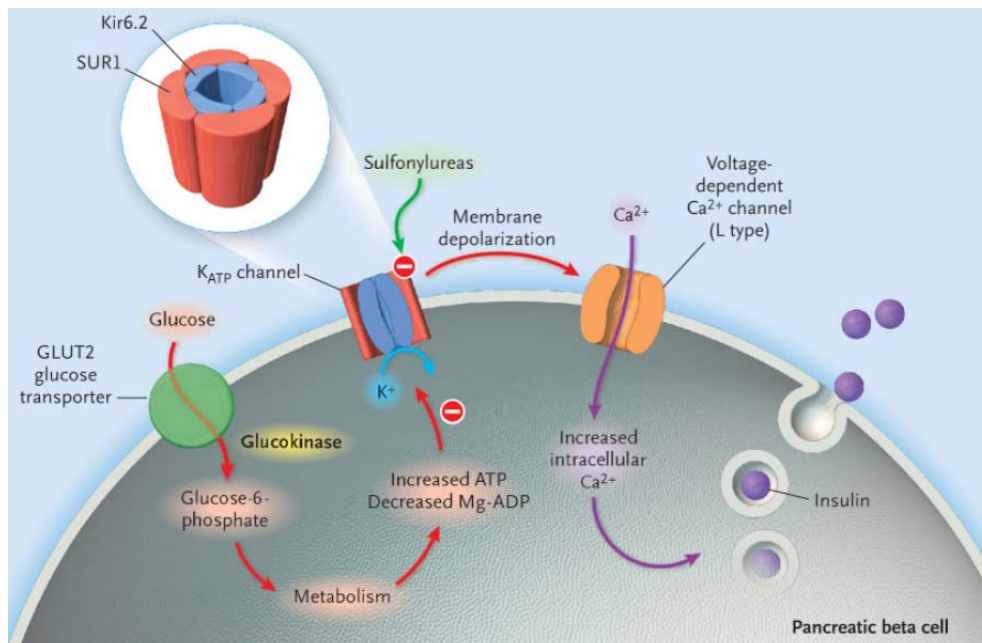


Figure 32. Mutations hétérozygotes, non-synonymes, du gène *INS* impliquées dans le diabète néonatal et le MODY

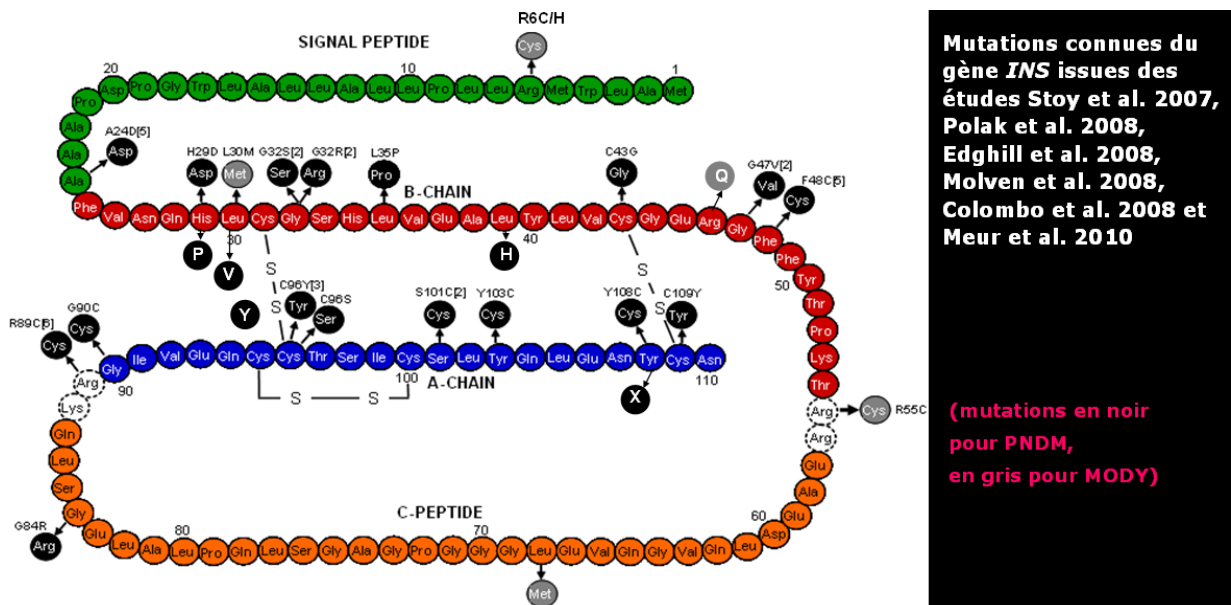


Figure 33. Exemple d'un graphique représentant le LOD-score d'une liaison génétique

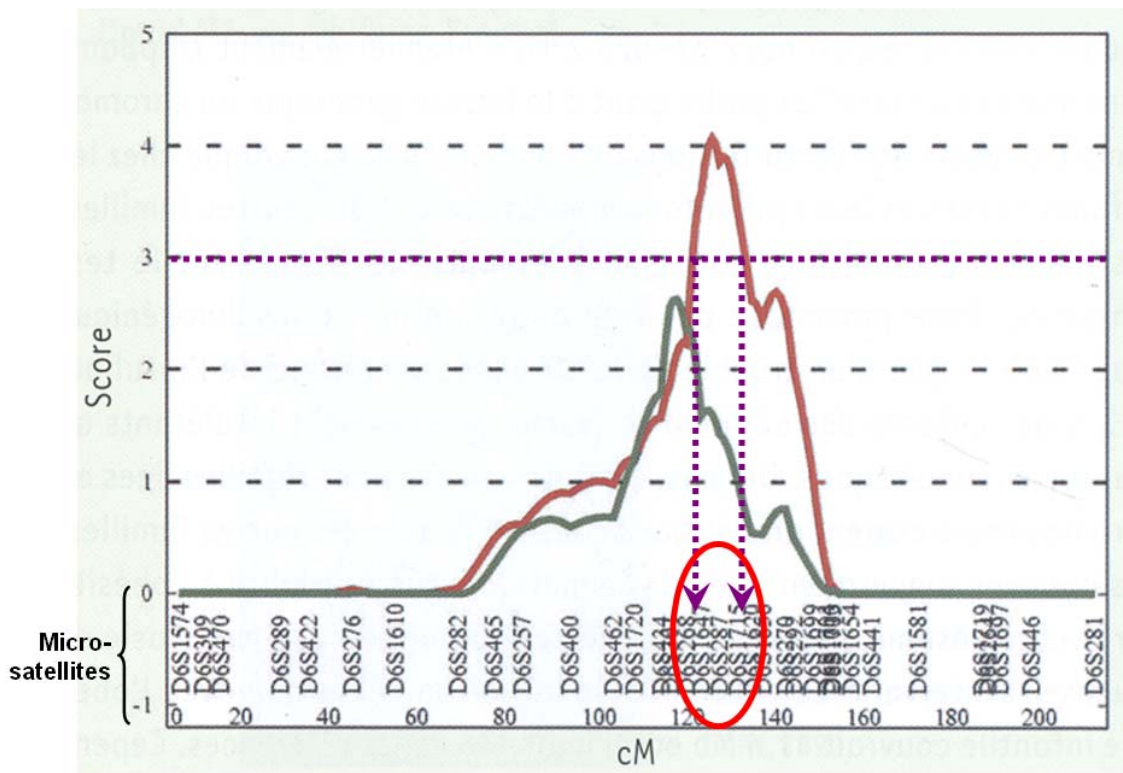
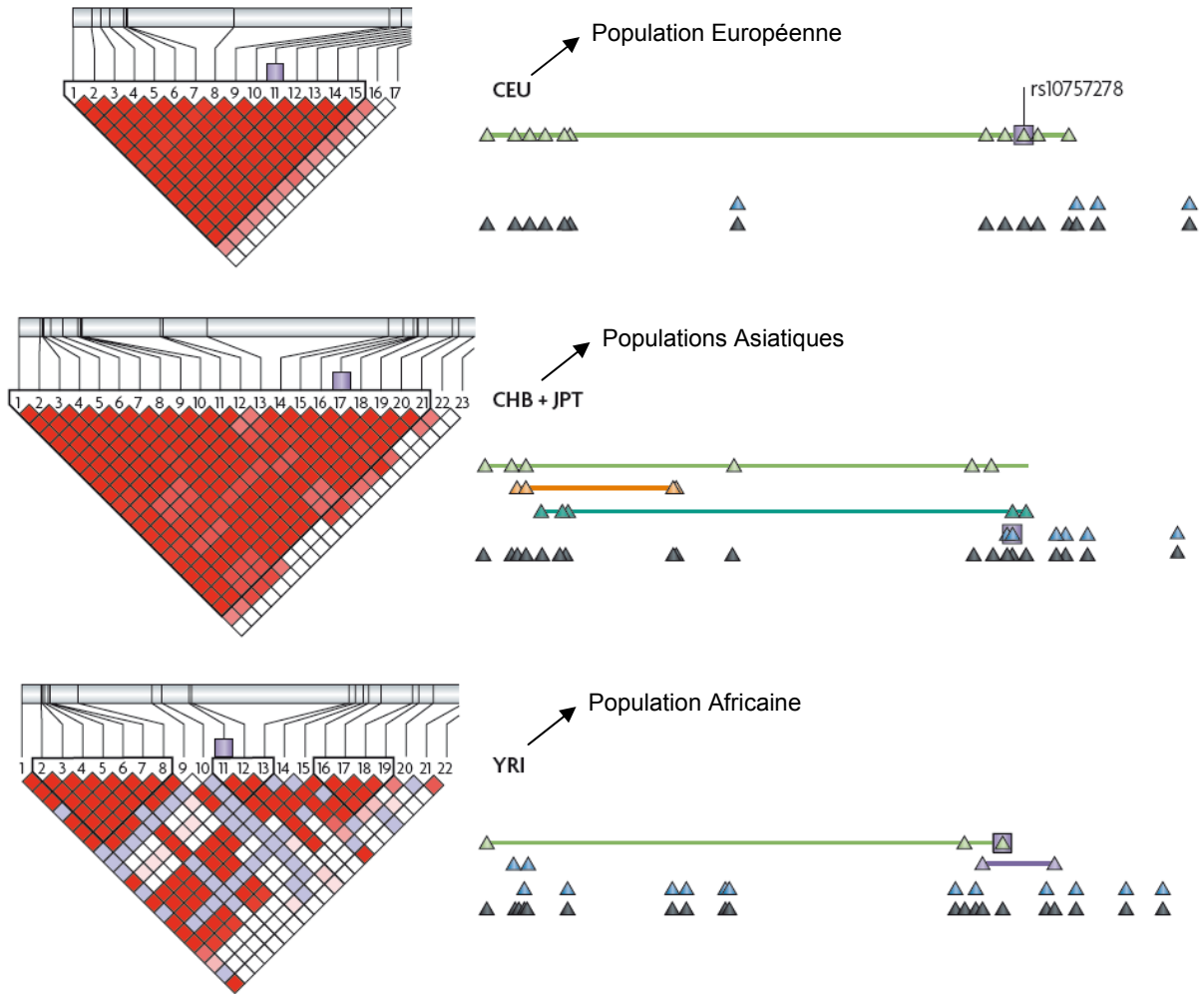


Figure 34. Les déséquilibres de liaison entre les SNPs communs dans le génome humain diffèrent fortement selon les populations étudiées.



(source : adapté de Frazer et al. Nature Reviews Genetics ; Avril 2009)

Figure 35. Répertoire des signaux d'association issus d'études GWAS publiées jusqu'à aujourd'hui

Published Genome-Wide Associations through 6/2010,
904 published GWA at $p \leq 5 \times 10^{-8}$ for 165 traits

NHGRI GWA Catalog
www.genome.gov/GWASTudies

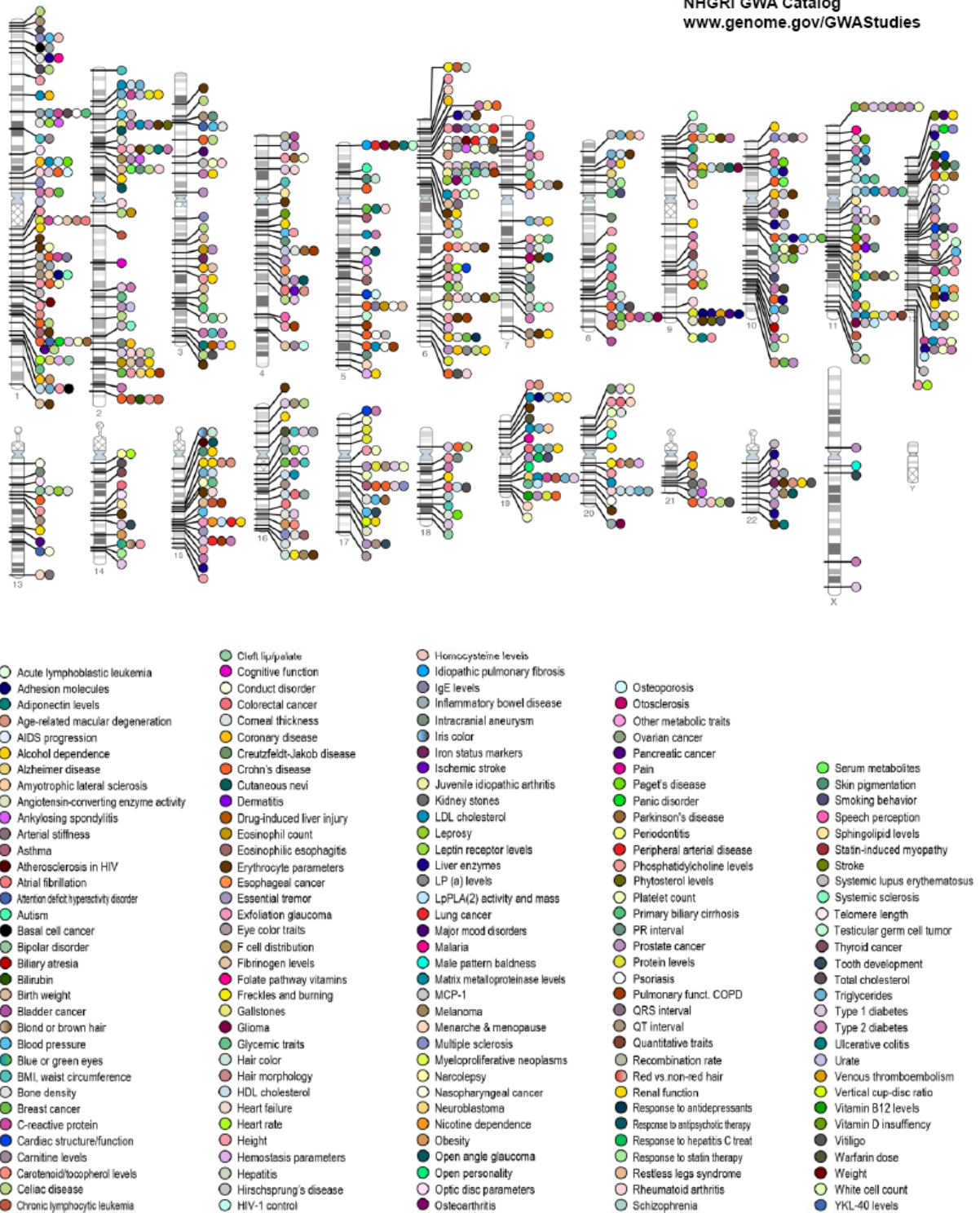


Figure 36. Passage d'études GWAS cas / contrôles à des études GWAS de traits quantitatifs

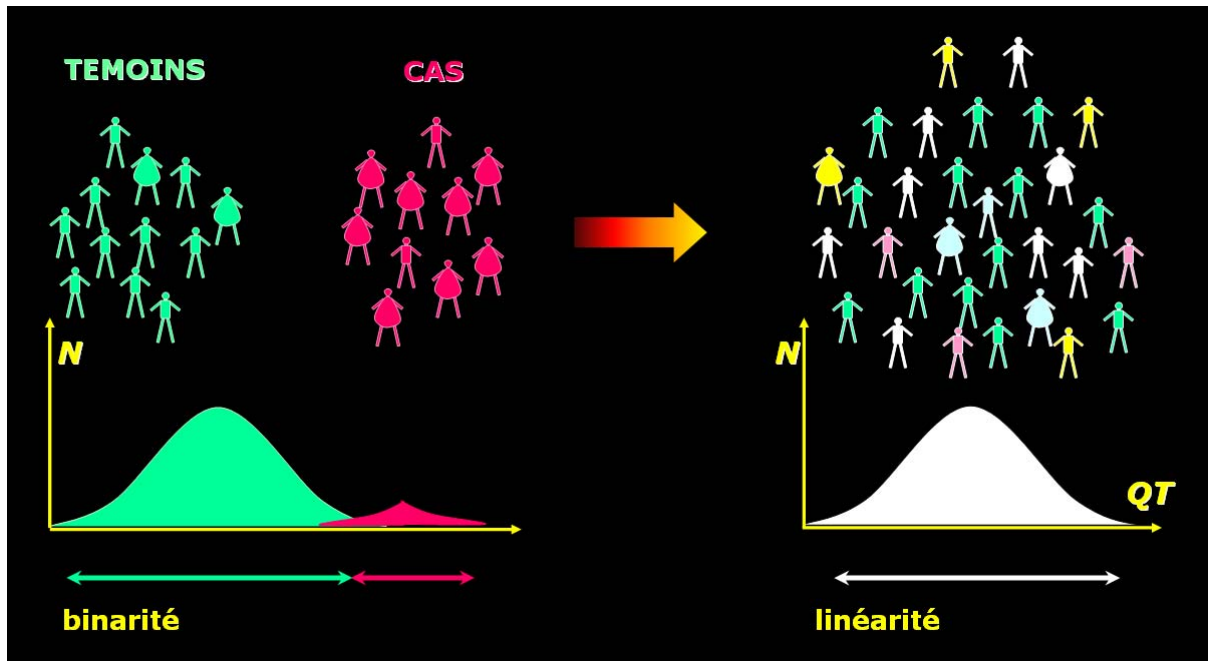


Figure 37. Synthèse de la mélatonine, « l'hormone de l'obscurité »

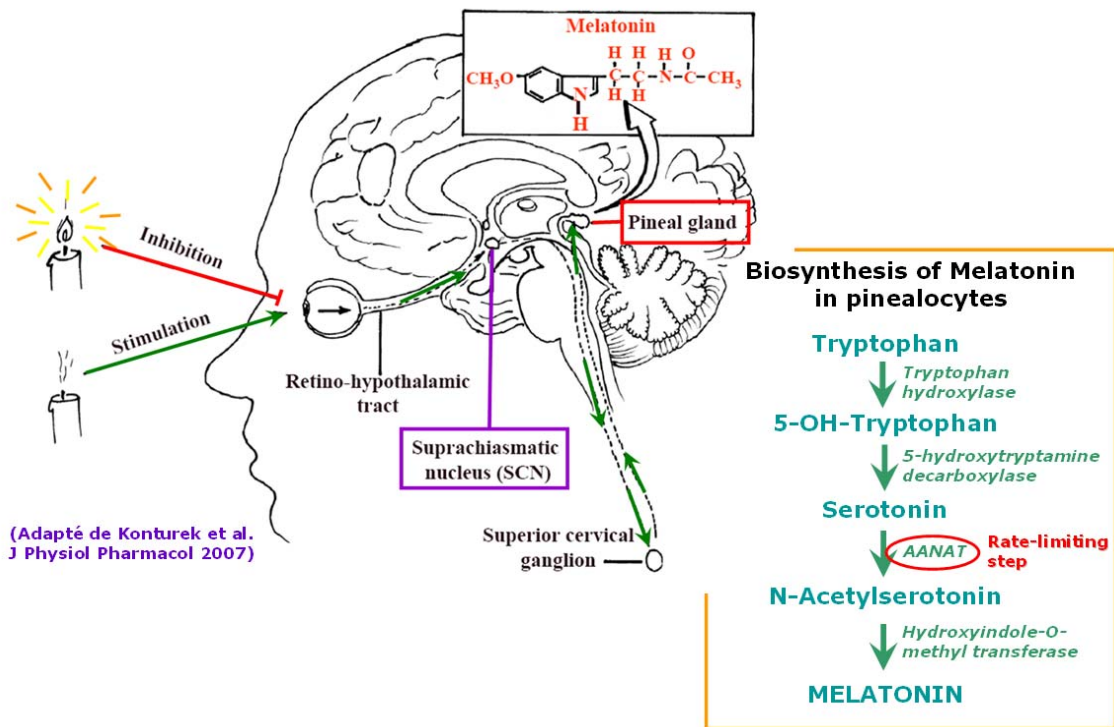


Figure 38. Répartition des 40 mutations non-synonymes identifiées après le séquençage des deux exons de *MTNR1B* chez ~ 7 000 individus

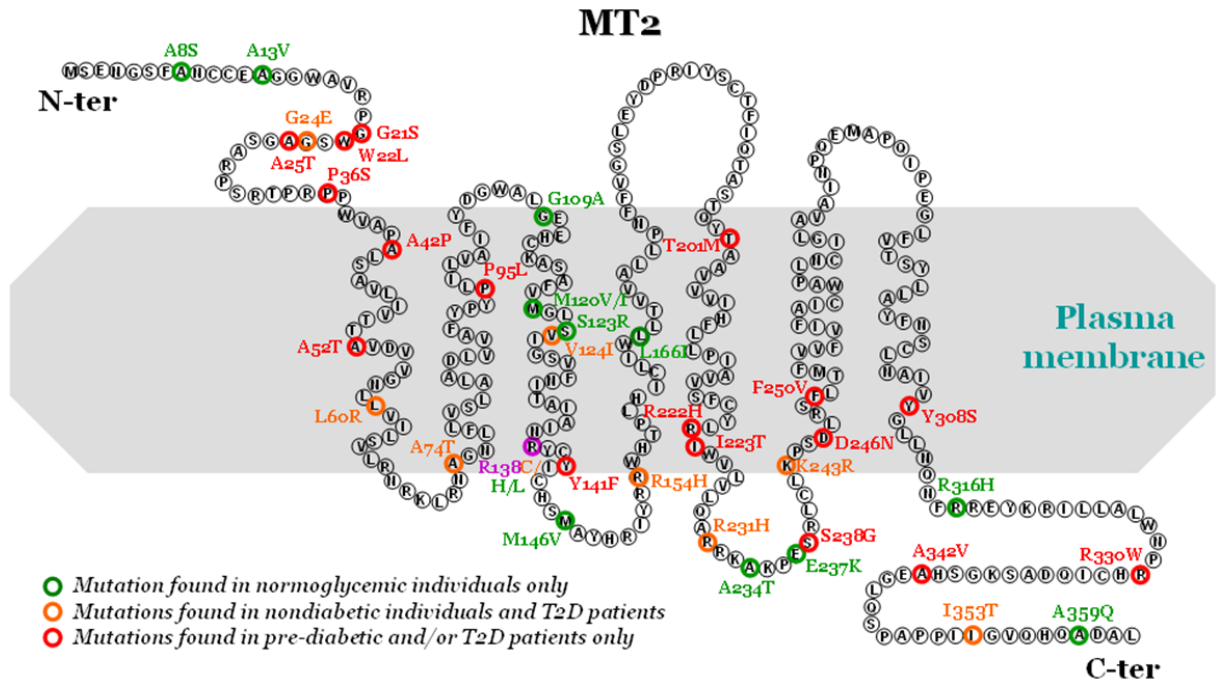


Figure 39. Chevauchement partiel entre les gènes de susceptibilité au DT2, les gènes associés à la glycémie à jeun (HOMA-B), et les gènes associés à l'insulinémie à jeun (HOMA-IR)

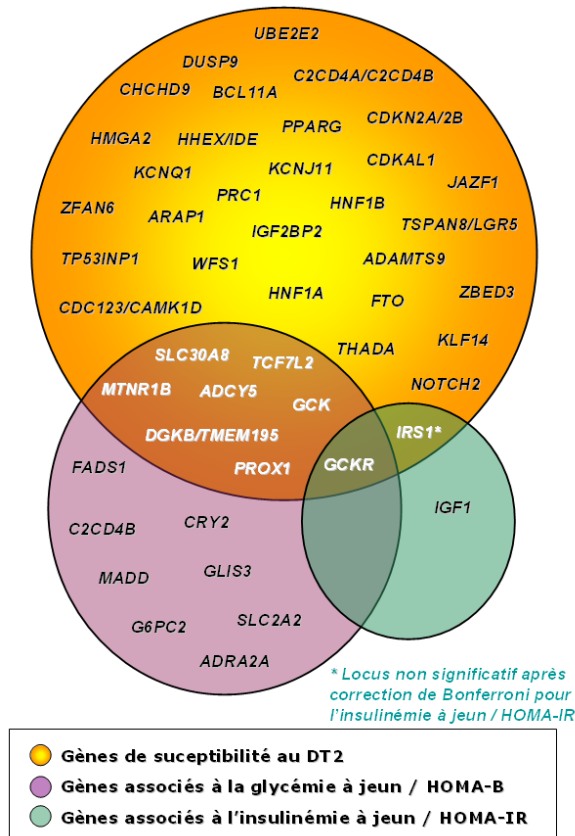
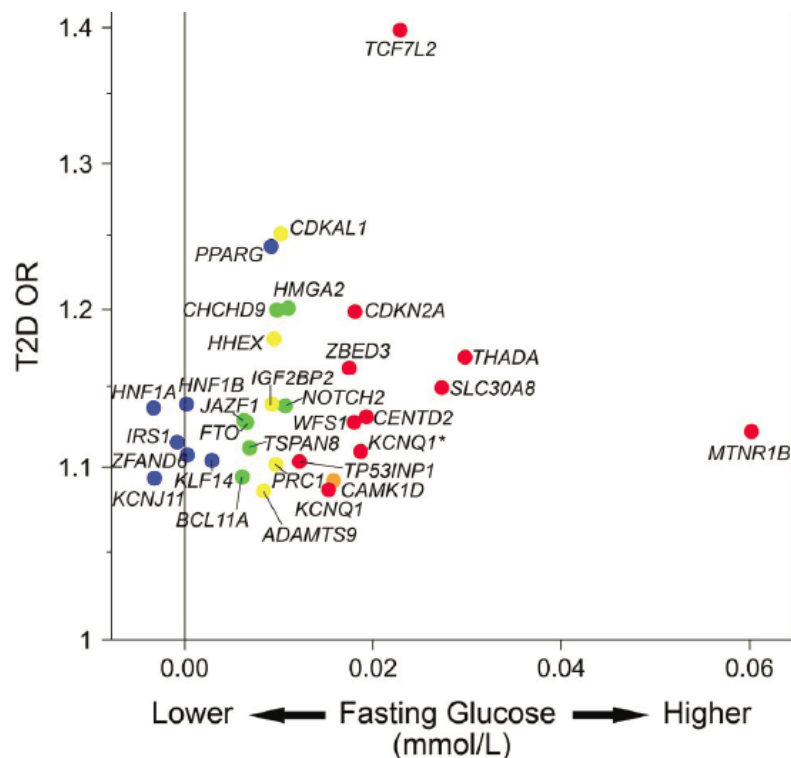
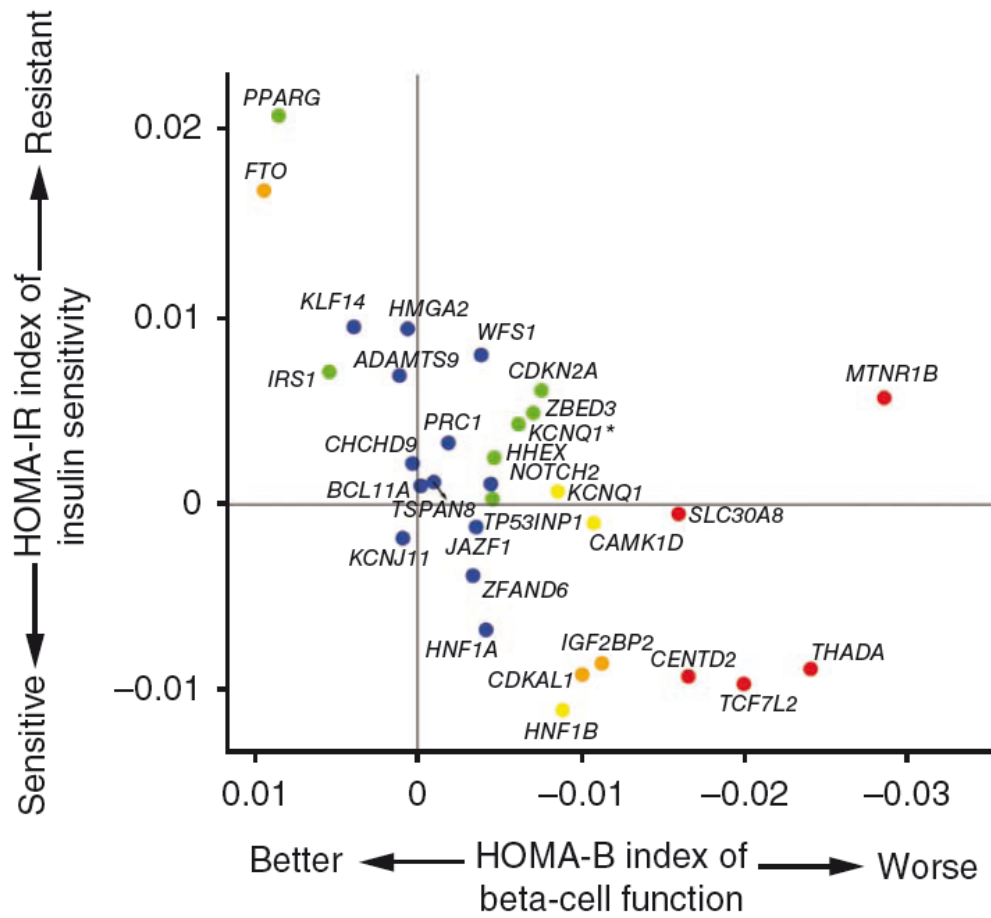


Figure 40. Répartition des gènes de susceptibilité au DT2 selon leurs effets sur le risque de DT2 (axe des ordonnées) et sur la glycémie à jeun (axe des abscisses)



(source : Voight et al. Nature Genetics ; Avril 2010)

Figure 41. Répartition des gènes de susceptibilité au DT2 selon leurs effets sur l'HOMA-IR (axe des ordonnées) et sur l'HOMA-B (axe des abscisses)



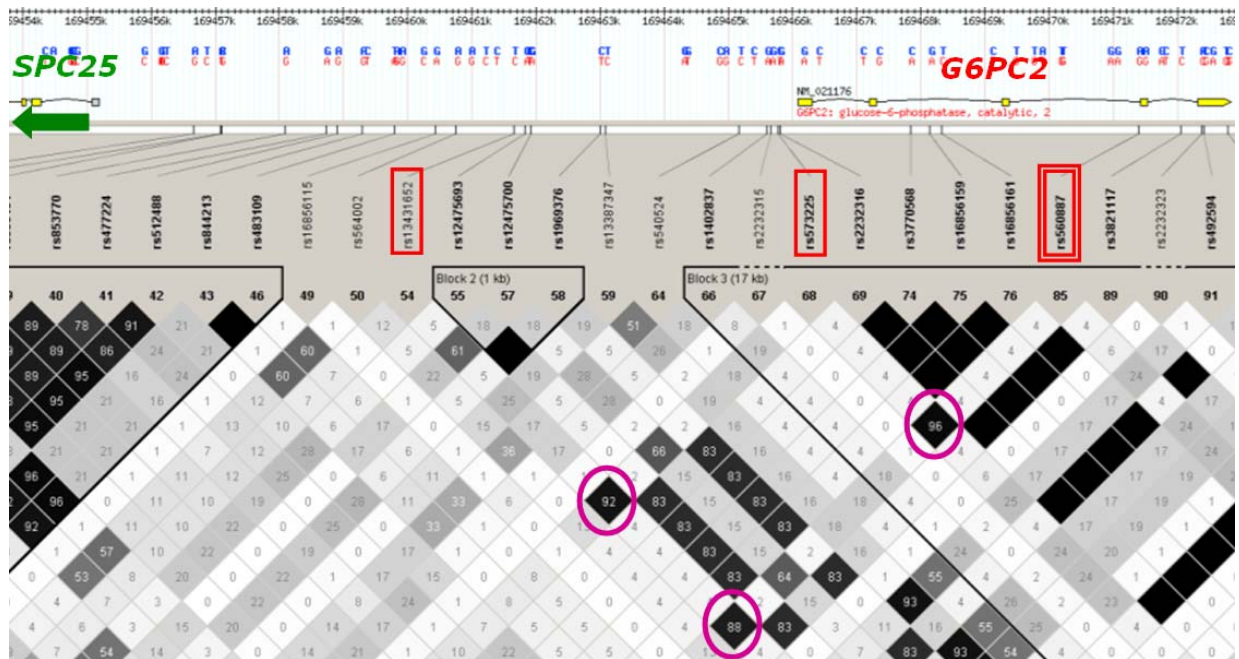
(source : Voight et al. Nature Genetics ; Avril 2010)

Figure 42. Déséquilibres de liaison au locus des gènes *G6PC2* et *ABCB11* (capture par le logiciel Haploview ; population HapMap Européenne)



→ plus le losange entre deux SNPs est foncé, plus le r^2 entre ces deux SNPs est fort

Figure 43. Déséquilibres de liaison au locus du gène *G6PC2* et dans sa zone promotrice (capture par le logiciel Haploview ; population HapMap Européenne)



→ Les valeurs indiquées sont des valeurs de r^2

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. <http://www.diabetesatlas.org/>:
2. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW: Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 365:1333-1346, 2005
3. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW: Type 2 diabetes: pathogenesis and treatment. *Lancet* 371:2153-2156, 2008
4. Kusnik-Joinville O, Weill A, Ricordeau P, Allemand H: Diabète traité en France en 2007 : un taux de prévalence proche de 4% et des disparités géographiques croissantes. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire* 43, 2008
5. Ricordeau P, Weill A, Vallier N, Bourrel R, Schwartz D, Guilhot J, Fender P, Allemand H: The prevalence and cost of diabetes in metropolitan France: what trends between 1998 and 2000? *Diabetes Metab* 29:497-504, 2003
6. Ma R, Tong P: Epidemiology of Type 2 Diabetes. *Textbook of Diabetes* 4th edition, 2010
7. Balkau B, Eschwege E: The diagnosis and classification of diabetes and impaired glucose regulation. *Textbook of Diabetes* 3rd edition, 2003
8. Olson DE, Rhee MK, Herrick K, Ziemer DC, Twombly JG, Phillips LS: Screening for diabetes and pre-diabetes with proposed A1C-based diagnostic criteria. *Diabetes Care* 33:2184-2189
9. Slama G: Type 1 diabetes: an overview. *Textbook of Diabetes* 3rd edition, 2003
10. Imagawa A, Hanafusa T, Miyagawa J, Matsuzawa Y: A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies. Osaka IDDM Study Group. *N Engl J Med* 342:301-307, 2000
11. Katsilambros N, Tentolouris N: Type 2 diabetes: an overview. *Textbook of Diabetes* 3rd edition, 2003
12. Velho G, Bellanne-Chantelot C, Timsit J: [MODY, a model of genotype/phenotype interactions in type 2 diabetes]. *Med Sci (Paris)* 19:854-859, 2003
13. Vaxillaire M, Froguel P: Genetic basis of maturity-onset diabetes of the young. *Endocrinol Metab Clin North Am* 35:371-384, x, 2006
14. Bonnefond A, Froguel P, Vaxillaire M: The emerging genetics of type 2 diabetes. *Trends Mol Med* 16:407-416
15. Vaxillaire M, D P, Bonnefond A, Froguel P: Breakthroughs in monogenic diabetes genetics: from pediatric forms to young adulthood diabetes. *Pediatr Endocrinol Rev* 6:405-417, 2009
16. Knowler WC, Bennett PH, Hamman RF, Miller M: Diabetes incidence and prevalence in Pima Indians: a 19-fold greater incidence than in Rochester, Minnesota. *Am J Epidemiol* 108:497-505, 1978
17. Flegal KM, Ezzati TM, Harris MI, Haynes SG, Juarez RZ, Knowler WC, Perez-Stable EJ, Stern MP: Prevalence of diabetes in Mexican Americans, Cubans, and Puerto Ricans from the Hispanic Health and Nutrition Examination Survey, 1982-1984. *Diabetes Care* 14:628-638, 1991
18. Poulsen P, Kyvik KO, Vaag A, Beck-Nielsen H: Heritability of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glucose tolerance--a population-based twin study. *Diabetologia* 42:139-145, 1999

19. Barnett AH, Eff C, Leslie RD, Pyke DA: Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia* 20:87-93, 1981
20. Ghosh S, Schork NJ: Genetic analysis of NIDDM. The study of quantitative traits. *Diabetes* 45:1-14, 1996
21. Speliotes EK, Willer CJ, Berndt SI, Monda KL, Thorleifsson G, Jackson AU, Allen HL, Lindgren CM, Luan J, Magi R, Randall JC, Vedantam S, Winkler TW, Qi L, Workalemahu T, Heid IM, Steinthorsdottir V, Stringham HM, Weedon MN, Wheeler E, Wood AR, Ferreira T, Weyant RJ, Segre AV, Estrada K, Liang L, Nemesh J, Park JH, Gustafsson S, Kilpelainen TO, Yang J, Bouatia-Naji N, Esko T, Feitosa MF, Kutalik Z, Mangino M, Raychaudhuri S, Scherag A, Smith AV, Welch R, Zhao JH, Aben KK, Absher DM, Amin N, Dixon AL, Fisher E, Glazer NL, Goddard ME, Heard-Costa NL, Hoesel V, Hottenga JJ, Johansson A, Johnson T, Ketkar S, Lamina C, Li S, Moffatt MF, Myers RH, Narisu N, Perry JR, Peters MJ, Preuss M, Ripatti S, Rivadeneira F, Sandholt C, Scott LJ, Timpson NJ, Tyrer JP, van Wingerden S, Watanabe RM, White CC, Wiklund F, Barlassina C, Chasman DI, Cooper MN, Jansson JO, Lawrence RW, Pellikka N, Prokopenko I, Shi J, Thiering E, Alavere H, Alibrandi MT, Almgren P, Arnold AM, Aspelund T, Atwood LD, Balkau B, Balmforth AJ, Bennett AJ, Ben-Shlomo Y, Bergman RN, Bergmann S, Biebermann H, Blakemore AI, Boes T, Bonnycastle LL, Bornstein SR, Brown MJ, Buchanan TA, Busonero F, Campbell H, Cappuccio FP, Cavalcanti-Proenca C, Chen YD, Chen CM, Chines PS, Clarke R, Coin L, Connell J, Day IN, Heijer MD, Duan J, Ebrahim S, Elliott P, Elosua R, Eiriksdottir G, Erdos MR, Eriksson JG, Facheris MF, Felix SB, Fischer-Posovszky P, Folsom AR, Friedrich N, Freimer NB, Fu M, Gaget S, Gejman PV, Geus EJ, Gieger C, Gjesing AP, Goel A, Goyette P, Grallert H, Grassler J, Greenawalt DM, Groves CJ, Gudnason V, Guiducci C, Hartikainen AL, Hassanali N, Hall AS, Havulinna AS, Hayward C, Heath AC, Hengstenberg C, Hicks AA, Hinney A, Hofman A, Homuth G, Hui J, Igl W, Iribarren C, Isomaa B, Jacobs KB, Jarick I, Jewell E, John U, Jorgensen T, Jousilahti P, Jula A, Kaakinen M, Kajantie E, Kaplan LM, Kathiresan S, Kettunen J, Kinnunen L, Knowles JW, Kolcic I, Konig IR, Koskinen S, Kovacs P, Kuusisto J, Kraft P, Kvaloy K, Laitinen J, Lantieri O, Lanzani C, Launer LJ, Lecoeur C, Lehtimaki T, Lettre G, Liu J, Lokki ML, Lorentzon M, Luben RN, Ludwig B, Manunta P, Marek D, Marre M, Martin NG, McArdle WL, McCarthy A, McKnight B, Meitinger T, Melander O, Meyre D, Midthjell K, Montgomery GW, Morken MA, Morris AP, Mulic R, Ngwa JS, Nelis M, Neville MJ, Nyholt DR, O'Donnell CJ, O'Rahilly S, Ong KK, Oostra B, Pare G, Parker AN, Perola M, Pichler I, Pietilainen KH, Platou CG, Polasek O, Pouta A, Rafelt S, Raitakari O, Rayner NW, Ridderstrale M, Rief W, Ruukonen A, Robertson NR, Rzehak P, Salomaa V, Sanders AR, Sandhu MS, Sanna S, Saramies J, Savolainen MJ, Scherag S, Schipf S, Schreiber S, Schunkert H, Silander K, Sinisalo J, Siscovick DS, Smit JH, Soranzo N, Sovio U, Stephens J, Surakka I, Swift AJ, Tammesoo ML, Tardif JC, Teder-Laving M, Teslovich TM, Thompson JR, Thomson B, Tonjes A, Tuomi T, van Meurs JB, van Ommen GJ, Vatin V, Viikari J, Visvikis-Siest S, Vitart V, Vogel CI, Voight BF, Waite LL, Wallaschofski H, Walters GB, Widen E, Wiegand S, Wild SH, Willemsen G, Witte DR, Witteman JC, Xu J, Zhang Q, Zgaga L, Ziegler A, Zitting P, Beilby JP, Farooqi IS, Hebebrand J, Huikuri HV, James AL, Kahonen M, Levinson DF, Macciardi F, Nieminen MS, Ohlsson C, Palmer LJ, Ridker PM, Stumvoll M, Beckmann JS, Boeing H, Boerwinkle E, Boomsma DI, Caulfield MJ, Chanock SJ, Collins FS, Cupples LA, Smith GD, Erdmann J, Froguel P, Gronberg H, Gyllensten U, Hall P, Hansen T, Harris TB, Hattersley AT, Hayes RB, Heinrich J, Hu FB, Hveem K, Illig T, Jarvelin MR, Kaprio J, Karpe F, Khaw KT, Kiemeny LA, Krude H, Laakso M, Lawlor DA, Metspalu A, Munroe PB, Ouwehand WH, Pedersen O, Penninx BW, Peters A, Pramstaller PP, Quertermous T, Reinehr T, Rissanen A, Rudan I, Samani NJ, Schwarz PE, Shuldiner AR, Spector TD, Tuomilehto J, Uda M, Uitterlinden A, Valle TT, Wabitsch M, Waeber G, Wareham NJ, Watkins H, Wilson JF, Wright AF, Zillikens MC, Chatterjee N, McCarroll SA,

- Purcell S, Schadt EE, Visscher PM, Assimes TL, Borecki IB, Deloukas P, Fox CS, Groop LC, Haritunians T, Hunter DJ, Kaplan RC, Mohlke KL, O'Connell JR, Peltonen L, Schlessinger D, Strachan DP, van Duijn CM, Wichmann HE, Frayling TM, Thorsteinsdottir U, Abecasis GR, Barroso I, Boehnke M, Stefansson K, North KE, M IM, Hirschhorn JN, Ingelsson E, Loos RJ: Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat Genet*
22. Kargar C, Ktorza A: Anatomohistologie fonctionnelle du pancréas. *Traité de diabétologie* 2ème édition, 2009
23. Jones PM, Persaud SJ: Islet function and insulin secretion. *Textbook of Diabetes* 4th edition, 2010
24. Bonner-Weir S: Anatomy of the islet of Langerhans. *The endocrine pancreas*:15-27, 1991
25. Magnan C, Ktorza A: Contrôle de la biosynthèse et de la sécrétion de l'insuline et du glucagon : aspects moléculaires, cellulaires et intégrés. *Traité de diabétologie* 2ème édition, 2009
26. Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A: The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2334-2339, 2006
27. Ravier MA, Guldenagel M, Charollais A, Gjinovci A, Caille D, Sohl G, Wollheim CB, Willecke K, Henquin JC, Meda P: Loss of connexin36 channels alters beta-cell coupling, islet synchronization of glucose-induced Ca²⁺ and insulin oscillations, and basal insulin release. *Diabetes* 54:1798-1807, 2005
28. Serre-Beinier V, Bosco D, Zulianello L, Charollais A, Caille D, Charpantier E, Gauthier BR, Diaferia GR, Giepmans BN, Lupi R, Marchetti P, Deng S, Buhler L, Berney T, Cirulli V, Meda P: Cx36 makes channels coupling human pancreatic beta-cells, and correlates with insulin expression. *Hum Mol Genet* 18:428-439, 2009
29. Jaques F, Jousset H, Tomas A, Prost AL, Wollheim CB, Irminger JC, Demaurex N, Halban PA: Dual effect of cell-cell contact disruption on cytosolic calcium and insulin secretion. *Endocrinology* 149:2494-2505, 2008
30. Konstantinova I, Nikolova G, Ohara-Imaizumi M, Meda P, Kucera T, Zarbalis K, Wurst W, Nagamatsu S, Lammert E: EphA-Ephrin-A-mediated beta cell communication regulates insulin secretion from pancreatic islets. *Cell* 129:359-370, 2007
31. Gin H, Rigalleau V: Physiopathologie du diabète non insulino-dépendant. *Traité de diabétologie* 2ème édition, 2009
32. Cooper GJ: Amylin compared with calcitonin gene-related peptide: structure, biology, and relevance to metabolic disease. *Endocr Rev* 15:163-201, 1994
33. Alshali M, Gerich JE: Abnormalities of insulin secretion and beta-cell defects in type 2 diabetes. *Textbook of Diabetes* 4th edition, 2010
34. Haataja L, Gurlo T, Huang CJ, Butler PC: Islet amyloid in type 2 diabetes, and the toxic oligomer hypothesis. *Endocr Rev* 29:303-316, 2008
35. Hoorens A, Van de Casteele M, Kloppel G, Pipeleers D: Glucose promotes survival of rat pancreatic beta cells by activating synthesis of proteins which suppress a constitutive apoptotic program. *J Clin Invest* 98:1568-1574, 1996
36. Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, Chick WL, Habener JF: Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:3434-3438, 1987
37. Melloul D, Marshak S, Cerasi E: Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia* 45:309-326, 2002
38. Li G, Rungger-Brandle E, Just I, Jonas JC, Aktories K, Wollheim CB: Effect of disruption of actin filaments by Clostridium botulinum C2 toxin on insulin secretion in HIT-T15 cells and pancreatic islets. *Mol Biol Cell* 5:1199-1213, 1994

39. Thurmond DC, Gonelle-Gispert C, Furukawa M, Halban PA, Pessin JE: Glucose-stimulated insulin secretion is coupled to the interaction of actin with the t-SNARE (target membrane soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor protein) complex. *Mol Endocrinol* 17:732-742, 2003
40. Boyd AE, 3rd, Bolton WE, Brinkley BR: Microtubules and beta cell function: effect of colchicine on microtubules and insulin secretion in vitro by mouse beta cells. *J Cell Biol* 92:425-434, 1982
41. Howell SL: The mechanism of insulin secretion. *Diabetologia* 26:319-327, 1984
42. Gerber SH, Sudhof TC: Molecular determinants of regulated exocytosis. *Diabetes* 51 Suppl 1:S3-11, 2002
43. Bratanova-Tochkova TK, Cheng H, Daniel S, Gunawardana S, Liu YJ, Mulvaney-Musa J, Schermerhorn T, Straub SG, Yajima H, Sharp GW: Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion. *Diabetes* 51 Suppl 1:S83-90, 2002
44. Del Guerra S, Lupi R, Marselli L, Masini M, Bugliani M, Sbrana S, Torri S, Pollera M, Boggi U, Mosca F, Del Prato S, Marchetti P: Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes* 54:727-735, 2005
45. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC: Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52:102-110, 2003
46. Marchetti P, Del Guerra S, Marselli L, Lupi R, Masini M, Pollera M, Bugliani M, Boggi U, Vistoli F, Mosca F, Del Prato S: Pancreatic islets from type 2 diabetic patients have functional defects and increased apoptosis that are ameliorated by metformin. *J Clin Endocrinol Metab* 89:5535-5541, 2004
47. Richardson CC, Hussain K, Jones PM, Persaud S, Lobner K, Boehm A, Clark A, Christie MR: Low levels of glucose transporters and K⁺ATP channels in human pancreatic beta cells early in development. *Diabetologia* 50:1000-1005, 2007
48. Van Schaftingen E: Short-term regulation of glucokinase. *Diabetologia* 37 Suppl 2:S43-47, 1994
49. Garcia-Herrero CM, Galan M, Vincent O, Flandez B, Gargallo M, Delgado-Alvarez E, Blazquez E, Navas MA: Functional analysis of human glucokinase gene mutations causing MODY2: exploring the regulatory mechanisms of glucokinase activity. *Diabetologia* 50:325-333, 2007
50. Fridlyand LE, Philipson LH: Glucose sensing in the pancreatic beta cell: a computational systems analysis. *Theor Biol Med Model* 7:15
51. Bataille D: Endosulfines: Novel regulators of insulin secretion. *Drug News Perspect* 13:453-462, 2000
52. Miki T, Nagashima K, Seino S: The structure and function of the ATP-sensitive K⁺ channel in insulin-secreting pancreatic beta-cells. *J Mol Endocrinol* 22:113-123, 1999
53. Jones PM, Persaud SJ, Howell SL: Time-course of Ca²⁺-induced insulin secretion from perfused, electrically permeabilised islets of Langerhans: effects of cAMP and a phorbol ester. *Biochem Biophys Res Commun* 162:998-1003, 1989
54. Prentki M, Matschinsky FM: Ca²⁺, cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. *Physiol Rev* 67:1185-1248, 1987
55. Szaszak M, Christian F, Rosenthal W, Klusmann E: Compartmentalized cAMP signalling in regulated exocytic processes in non-neuronal cells. *Cell Signal* 20:590-601, 2008
56. Henquin JC, Meissner HP: Cyclic adenosine monophosphate differently affects the response of mouse pancreatic beta-cells to various amino acids. *J Physiol* 381:77-93, 1986
57. Malaisse WJ, Malaisse-Lagae F, Sener A, Hellerstrom C: Participation of endogenous fatty acids in the secretory activity of the pancreatic B-cell. *Biochem J* 227:995-1002, 1985

58. Stein DT, Stevenson BE, Chester MW, Basit M, Daniels MB, Turley SD, McGarry JD: The insulinotropic potency of fatty acids is influenced profoundly by their chain length and degree of saturation. *J Clin Invest* 100:398-403, 1997
59. Sharp GW: Mechanisms of inhibition of insulin release. *Am J Physiol* 271:C1781-1799, 1996
60. Nilsson T, Arkhammar P, Rorsman P, Berggren PO: Suppression of insulin release by galanin and somatostatin is mediated by a G-protein. An effect involving repolarization and reduction in cytoplasmic free Ca²⁺ concentration. *J Biol Chem* 264:973-980, 1989
61. Tong J, Prigeon RL, Davis HW, Bidlingmaier M, Kahn SE, Cummings DE, Tschop MH, D'Alessio D: Ghrelin suppresses glucose-stimulated insulin secretion and deteriorates glucose tolerance in healthy humans. *Diabetes* 59:2145-2151
62. Ahren B: Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia* 43:393-410, 2000
63. Jones PM, Persaud SJ: Protein kinases, protein phosphorylation, and the regulation of insulin secretion from pancreatic beta-cells. *Endocr Rev* 19:429-461, 1998
64. Gilon P, Henquin JC: Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. *Endocr Rev* 22:565-604, 2001
65. Winzell MS, Ahren B: Role of VIP and PACAP in islet function. *Peptides* 28:1805-1813, 2007
66. Winzell MS, Ahren B: G-protein-coupled receptors and islet function-implications for treatment of type 2 diabetes. *Pharmacol Ther* 116:437-448, 2007
67. McIntyre N, Holdsworth CD, Turner DS: New Interpretation of Oral Glucose Tolerance. *Lancet* 2:20-21, 1964
68. Drucker DJ: The role of gut hormones in glucose homeostasis. *J Clin Invest* 117:24-32, 2007
69. Kieffer TJ, Habener JF: The glucagon-like peptides. *Endocr Rev* 20:876-913, 1999
70. Drucker DJ, Nauck MA: The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet* 368:1696-1705, 2006
71. Porksen N, Hollingdal M, Juhl C, Butler P, Veldhuis JD, Schmitz O: Pulsatile insulin secretion: detection, regulation, and role in diabetes. *Diabetes* 51 Suppl 1:S245-254, 2002
72. Porksen N, Grofte B, Nyholm B, Holst JJ, Pincus SM, Veldhuis JD, Schmitz O, Butler PC: Glucagon-like peptide 1 increases mass but not frequency or orderliness of pulsatile insulin secretion. *Diabetes* 47:45-49, 1998
73. Porksen NK, Munn SR, Steers JL, Schmitz O, Veldhuis JD, Butler PC: Mechanisms of sulfonylurea's stimulation of insulin secretion in vivo: selective amplification of insulin secretory burst mass. *Diabetes* 45:1792-1797, 1996
74. Porksen N, Munn S, Steers J, Veldhuis JD, Butler PC: Effects of glucose ingestion versus infusion on pulsatile insulin secretion. The incretin effect is achieved by amplification of insulin secretory burst mass. *Diabetes* 45:1317-1323, 1996
75. Porksen N, Munn SR, Steers JL, Veldhuis JD, Butler PC: Effects of somatostatin on pulsatile insulin secretion: elective inhibition of insulin burst mass. *Am J Physiol* 270:E1043-1049, 1996
76. Porksen N, Hussain MA, Bianda TL, Nyholm B, Christiansen JS, Butler PC, Veldhuis JD, Froesch ER, Schmitz O: IGF-I inhibits burst mass of pulsatile insulin secretion at supraphysiological and low IGF-I infusion rates. *Am J Physiol* 272:E352-358, 1997
77. Sturis J, Polonsky KS, Shapiro ET, Blackman JD, O'Meara NM, van Cauter E: Abnormalities in the ultradian oscillations of insulin secretion and glucose levels in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 35:681-689, 1992
78. Marcheava B, Ramsey KM, Buhr ED, Kobayashi Y, Su H, Ko CH, Ivanova G, Omura C, Mo S, Vitaterna MH, Lopez JP, Philipson LH, Bradfield CA, Crosby SD, JeBailey L, Wang

- X, Takahashi JS, Bass J: Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature* 466:627-631
79. U.K. prospective diabetes study 16. Overview of 6 years' therapy of type II diabetes: a progressive disease. U.K. Prospective Diabetes Study Group. *Diabetes* 44:1249-1258, 1995
80. Van Haefen TW, Van Maarschalkerweerd WW, Gerich JE, Van der Veen EA: Decreased insulin secretory capacity and normal pancreatic B-cell glucose sensitivity in non-obese patients with NIDDM. *Eur J Clin Invest* 21:168-174, 1991
81. Ward WK, Bolgiano DC, McKnight B, Halter JB, Porte D, Jr.: Diminished B cell secretory capacity in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 74:1318-1328, 1984
82. Yki-Jarvinen H: Glucose toxicity. *Endocr Rev* 13:415-431, 1992
83. Meyer J, Sturis J, Katschinski M, Arnold R, Goke B, Byrne MM: Acute hyperglycemia alters the ability of the normal beta-cell to sense and respond to glucose. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282:E917-922, 2002
84. Poitout V, Robertson RP: Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev* 29:351-366, 2008
85. Jansson PA, Larsson A, Smith U, Lonroth P: Glycerol production in subcutaneous adipose tissue in lean and obese humans. *J Clin Invest* 89:1610-1617, 1992
86. Taskinen MR, Bogardus C, Kennedy A, Howard BV: Multiple disturbances of free fatty acid metabolism in noninsulin-dependent diabetes. Effect of oral hypoglycemic therapy. *J Clin Invest* 76:637-644, 1985
87. Chan CB, MacDonald PE, Saleh MC, Johns DC, Marban E, Wheeler MB: Overexpression of uncoupling protein 2 inhibits glucose-stimulated insulin secretion from rat islets. *Diabetes* 48:1482-1486, 1999
88. Hagman DK, Hays LB, Parazzoli SD, Poitout V: Palmitate inhibits insulin gene expression by altering PDX-1 nuclear localization and reducing MafA expression in isolated rat islets of Langerhans. *J Biol Chem* 280:32413-32418, 2005
89. Salehi M, Aulinger BA, D'Alessio DA: Targeting beta-cell mass in type 2 diabetes: promise and limitations of new drugs based on incretins. *Endocr Rev* 29:367-379, 2008
90. O'Donovan DG, Doran S, Feinle-Bisset C, Jones KL, Meyer JH, Wishart JM, Morris HA, Horowitz M: Effect of variations in small intestinal glucose delivery on plasma glucose, insulin, and incretin hormones in healthy subjects and type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 89:3431-3435, 2004
91. Amori RE, Lau J, Pittas AG: Efficacy and safety of incretin therapy in type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis. *Jama* 298:194-206, 2007
92. Kitamura T, Kahn CR, Accili D: Insulin receptor knockout mice. *Annu Rev Physiol* 65:313-332, 2003
93. Wu X, Garvey W: Insulin action *Textbook of Diabetes* 4th edition, 2010
94. Burnol AF: Mécanisme d'action de l'insuline. *Traité de diabétologie* 2ème édition, 2009
95. Andreelli F, Girard J: Régulation de l'homéostasie glucidique. *Traité de diabétologie* 2ème édition, 2009
96. Fernandez-Novell JM, Bellido D, Vilaro S, Guinovart JJ: Glucose induces the translocation of glycogen synthase to the cell cortex in rat hepatocytes. *Biochem J* 321 (Pt 1):227-231, 1997
97. Summers SA, Kao AW, Kohn AD, Backus GS, Roth RA, Pessin JE, Birnbaum MJ: The role of glycogen synthase kinase 3beta in insulin-stimulated glucose metabolism. *J Biol Chem* 274:17934-17940, 1999
98. Jeng CY, Sheu WH, Fuh MM, Chen YD, Reaven GM: Relationship between hepatic glucose production and fasting plasma glucose concentration in patients with NIDDM. *Diabetes* 43:1440-1444, 1994

99. Mitrakou A, Kelley D, Veneman T, Jenssen T, Pangburn T, Reilly J, Gerich J: Contribution of abnormal muscle and liver glucose metabolism to postprandial hyperglycemia in NIDDM. *Diabetes* 39:1381-1390, 1990
100. Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Hakkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijarvi A, Halavaara J, Yki-Jarvinen H: Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3023-3028, 2002
101. Kelley D, Mitrakou A, Marsh H, Schwenk F, Benn J, Sonnenberg G, Arcangeli M, Aoki T, Sorensen J, Berger M, et al.: Skeletal muscle glycolysis, oxidation, and storage of an oral glucose load. *J Clin Invest* 81:1563-1571, 1988
102. Basu A, Basu R, Shah P, Vella A, Johnson CM, Jensen M, Nair KS, Schwenk WF, Rizza RA: Type 2 diabetes impairs splanchnic uptake of glucose but does not alter intestinal glucose absorption during enteral glucose feeding: additional evidence for a defect in hepatic glucokinase activity. *Diabetes* 50:1351-1362, 2001
103. Yki-Jarvinen H: Insulin resistance in type 2 diabetes. *Textbook of Diabetes* 4th edition, 2010
104. Sparks JD, Sparks CE: Insulin modulation of hepatic synthesis and secretion of apolipoprotein B by rat hepatocytes. *J Biol Chem* 265:8854-8862, 1990
105. Malmstrom R, Packard CJ, Caslake M, Bedford D, Stewart P, Yki-Jarvinen H, Shepherd J, Taskinen MR: Defective regulation of triglyceride metabolism by insulin in the liver in NIDDM. *Diabetologia* 40:454-462, 1997
106. Santos JM, Ribeiro SB, Gaya AR, Appell HJ, Duarte JA: Skeletal muscle pathways of contraction-enhanced glucose uptake. *Int J Sports Med* 29:785-794, 2008
107. Goodyear LJ: AMP-activated protein kinase: a critical signaling intermediary for exercise-stimulated glucose transport? *Exerc Sport Sci Rev* 28:113-116, 2000
108. DeFronzo RA, Gunnarsson R, Bjorkman O, Olsson M, Wahren J: Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *J Clin Invest* 76:149-155, 1985
109. Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, Pratipanawatr T, DeFronzo RA, Kahn CR, Mandarino LJ: Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest* 105:311-320, 2000
110. Pendergrass M, Koval J, Vogt C, Yki-Jarvinen H, Iozzo P, Pipek R, Ardehali H, Printz R, Granner D, DeFronzo RA, Mandarino LJ: Insulin-induced hexokinase II expression is reduced in obesity and NIDDM. *Diabetes* 47:387-394, 1998
111. Zierath JR, Krook A, Wallberg-Henriksson H: Insulin action in skeletal muscle from patients with NIDDM. *Mol Cell Biochem* 182:153-160, 1998
112. Manson JE, Nathan DM, Krolewski AS, Stampfer MJ, Willett WC, Hennekens CH: A prospective study of exercise and incidence of diabetes among US male physicians. *Jama* 268:63-67, 1992
113. Manson JE, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Krolewski AS, Rosner B, Hennekens CH, Speizer FE: Physical activity and incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. *Lancet* 338:774-778, 1991
114. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P, Carlsson E, Ridderstrale M, Laurila E, Houstis N, Daly MJ, Patterson N, Mesirov JP, Golub TR, Tamayo P, Spiegelman B, Lander ES, Hirschhorn JN, Altshuler D, Groop LC: PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 34:267-273, 2003
115. Copeland RJ, Bullen JW, Hart GW: Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: roles in insulin resistance and glucose toxicity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295:E17-28, 2008

116. Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Hasty AH, Osuga J, Tamura Y, Shionoiri F, Iizuka Y, Ohashi K, Harada K, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N: Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem* 274:35832-35839, 1999
117. Blanchette-Mackie EJ, Dwyer NK, Barber T, Coxey RA, Takeda T, Rondinone CM, Theodorakis JL, Greenberg AS, Londos C: Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes. *J Lipid Res* 36:1211-1226, 1995
118. Holm C: Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem Soc Trans* 31:1120-1124, 2003
119. Groop LC, Bonadonna RC, DelPrato S, Ratheiser K, Zyck K, Ferrannini E, DeFronzo RA: Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for multiple sites of insulin resistance. *J Clin Invest* 84:205-213, 1989
120. Frazee E, Donner CC, Swislocki AL, Chiou YA, Chen YD, Reaven GM: Ambient plasma free fatty acid concentrations in noninsulin-dependent diabetes mellitus: evidence for insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 61:807-811, 1985
121. Gin H, Rigalleau V: Physiopathologie du diabète non-insulino-dépendant. *Traité de diabétologie* 2ème édition, 2009
122. Phear DN: The normal and diabetic patterns of insulin response to glucose. *Lancet* 2:955-958, 1962
123. Florez JC: Newly identified loci highlight beta cell dysfunction as a key cause of type 2 diabetes: where are the insulin resistance genes? *Diabetologia* 51:1100-1110, 2008
124. Grant RW, Moore AF, Florez JC: Genetic architecture of type 2 diabetes: recent progress and clinical implications. *Diabetes Care* 32:1107-1114, 2009
125. Yoshioka M, Kayo T, Ikeda T, Koizumi A: A novel locus, Mody4, distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice. *Diabetes* 46:887-894, 1997
126. Kamiya M, Judson H, Okazaki Y, Kusakabe M, Muramatsu M, Takada S, Takagi N, Arima T, Wake N, Kamimura K, Satomura K, Hermann R, Bonthron DT, Hayashizaki Y: The cell cycle control gene ZAC/PLAGL1 is imprinted--a strong candidate gene for transient neonatal diabetes. *Hum Mol Genet* 9:453-460, 2000
127. Temple IK, Shield JP: Transient neonatal diabetes, a disorder of imprinting. *J Med Genet* 39:872-875, 2002
128. Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, Helgason A, Stefansson H, Emilsson V, Helgadóttir A, Styrkarsdóttir U, Magnusson KP, Walters GB, Palsdóttir E, Jonsdóttir T, Gudmundsdóttir T, Gylfason A, Saemundsdóttir J, Wilensky RL, Reilly MP, Rader DJ, Bagger Y, Christiansen C, Gudnason V, Sigurdsson G, Thorsteinsdóttir U, Gulcher JR, Kong A, Stefansson K: Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 38:320-323, 2006
129. Kruglyak L: The road to genome-wide association studies. *Nat Rev Genet* 9:314-318, 2008
130. Frazer KA, Murray SS, Schork NJ, Topol EJ: Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet* 10:241-251, 2009
131. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, McCarthy MI, Ramos EM, Cardon LR, Chakravarti A, Cho JH, Guttmacher AE, Kong A, Kruglyak L, Mardis E, Rotimi CN, Slatkin M, Valle D, Whittemore AS, Boehnke M, Clark AG, Eichler EE, Gibson G, Haines JL, Mackay TF, McCarroll SA, Visscher PM: Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 461:747-753, 2009
132. <http://www.genome.gov/26525384>
133. Voight BF, Scott LJ, Steinthorsdóttir V, Morris AP, Dina C, Welch RP, Zeggini E, Huth C, Aulchenko YS, Thorleifsson G, McCulloch LJ, Ferreira T, Grallert H, Amin N, Wu G,

Willer CJ, Raychaudhuri S, McCarroll SA, Langenberg C, Hofmann OM, Dupuis J, Qi L, Segre AV, van Hoek M, Navarro P, Ardlie K, Balkau B, Benediktsson R, Bennett AJ, Blagieva R, Boerwinkle E, Bonnycastle LL, Bengtsson Bostrom K, Bravenboer B, Bumpstead S, Burt NP, Charpentier G, Chines PS, Cornelis M, Couper DJ, Crawford G, Doney AS, Elliott KS, Elliott AL, Erdos MR, Fox CS, Franklin CS, Ganser M, Gieger C, Grarup N, Green T, Griffin S, Groves CJ, Guiducci C, Hadjadj S, Hassanali N, Herder C, Isomaa B, Jackson AU, Johnson PR, Jorgensen T, Kao WH, Klopp N, Kong A, Kraft P, Kuusisto J, Lauritzen T, Li M, Lieveise A, Lindgren CM, Lyssenko V, Marre M, Meitinger T, Midthjell K, Morken MA, Narisu N, Nilsson P, Owen KR, Payne F, Perry JR, Petersen AK, Platou C, Proenca C, Prokopenko I, Rathmann W, Rayner NW, Robertson NR, Rocheleau G, Roden M, Sampson MJ, Saxena R, Shields BM, Shradler P, Sigurdsson G, Sparso T, Strassburger K, Stringham HM, Sun Q, Swift AJ, Thorand B, Tichet J, Tuomi T, van Dam RM, van Haeften TW, van Herpt T, van Vliet-Ostaptchouk JV, Walters GB, Weedon MN, Wijmenga C, Witteman J, Bergman RN, Cauchi S, Collins FS, Gloyn AL, Gyllenstein U, Hansen T, Hide WA, Hitman GA, Hofman A, Hunter DJ, Hveem K, Laakso M, Mohlke KL, Morris AD, Palmer CN, Pramstaller PP, Rudan I, Sijbrands E, Stein LD, Tuomilehto J, Uitterlinden A, Walker M, Wareham NJ, Watanabe RM, Abecasis GR, Boehm BO, Campbell H, Daly MJ, Hattersley AT, Hu FB, Meigs JB, Pankow JS, Pedersen O, Wichmann HE, Barroso I, Florez JC, Frayling TM, Groop L, Sladek R, Thorsteinsdottir U, Wilson JF, Illig T, Froguel P, van Duijn CM, Stefansson K, Altshuler D, Boehnke M, McCarthy MI: Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nat Genet* 42:579-589

134. Yamauchi T, Hara K, Maeda S, Yasuda K, Takahashi A, Horikoshi M, Nakamura M, Fujita H, Grarup N, Cauchi S, Ng DP, Ma RC, Tsunoda T, Kubo M, Watada H, Maegawa H, Okada-Iwabu M, Iwabu M, Shojima N, Shin HD, Andersen G, Witte DR, Jorgensen T, Lauritzen T, Sandbaek A, Hansen T, Ohshige T, Omori S, Saito I, Kaku K, Hirose H, So WY, Beury D, Chan JC, Park KS, Tai ES, Ito C, Tanaka Y, Kashiwagi A, Kawamori R, Kasuga M, Froguel P, Pedersen O, Kamatani N, Nakamura Y, Kadowaki T: A genome-wide association study in the Japanese population identifies susceptibility loci for type 2 diabetes at UBE2E2 and C2CD4A-C2CD4B. *Nat Genet* 42:864-868

135. van de Bunt M, Gloyn AL: From genetic association to molecular mechanism. *Curr Diab Rep* 10:452-466

136. DeFronzo RA, Ferrannini E: Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 14:173-194, 1991

137. Xiang AH, Wang C, Peters RK, Trigo E, Kjos SL, Buchanan TA: Coordinate changes in plasma glucose and pancreatic beta-cell function in Latino women at high risk for type 2 diabetes. *Diabetes* 55:1074-1079, 2006

138. Mason CC, Hanson RL, Knowler WC: Progression to type 2 diabetes characterized by moderate then rapid glucose increases. *Diabetes* 56:2054-2061, 2007

139. Chen WM, Erdos MR, Jackson AU, Saxena R, Sanna S, Silver KD, Timpson NJ, Hansen T, Orru M, Grazia Piras M, Bonnycastle LL, Willer CJ, Lyssenko V, Shen H, Kuusisto J, Ebrahim S, Sestu N, Duren WL, Spada MC, Stringham HM, Scott LJ, Olla N, Swift AJ, Najjar S, Mitchell BD, Lawlor DA, Smith GD, Ben-Shlomo Y, Andersen G, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Saramies J, Valle TT, Buchanan TA, Shuldiner AR, Lakatta E, Bergman RN, Uda M, Tuomilehto J, Pedersen O, Cao A, Groop L, Mohlke KL, Laakso M, Schlessinger D, Collins FS, Altshuler D, Abecasis GR, Boehnke M, Scuteri A, Watanabe RM: Variations in the G6PC2/ABCB11 genomic region are associated with fasting glucose levels. *J Clin Invest* 118:2620-2628, 2008

140. Winckler W, Weedon MN, Graham RR, McCarroll SA, Purcell S, Almgren P, Tuomi T, Gaudet D, Bostrom KB, Walker M, Hitman G, Hattersley AT, McCarthy MI, Ardlie KG, Hirschhorn JN, Daly MJ, Frayling TM, Groop L, Altshuler D: Evaluation of common variants in the six known maturity-onset diabetes of the young (MODY) genes for association with type 2 diabetes. *Diabetes* 56:685-693, 2007
141. Orho-Melander M, Melander O, Guiducci C, Perez-Martinez P, Corella D, Roos C, Tewhey R, Rieder MJ, Hall J, Abecasis G, Tai ES, Welch C, Arnett DK, Lyssenko V, Lindholm E, Saxena R, de Bakker PI, Burt N, Voight BF, Hirschhorn JN, Tucker KL, Hedner T, Tuomi T, Isomaa B, Eriksson KF, Taskinen MR, Wahlstrand B, Hughes TE, Parnell LD, Lai CQ, Berglund G, Peltonen L, Vartiainen E, Jousilahti P, Havulinna AS, Salomaa V, Nilsson P, Groop L, Altshuler D, Ordovas JM, Kathiresan S: Common missense variant in the glucokinase regulatory protein gene is associated with increased plasma triglyceride and C-reactive protein but lower fasting glucose concentrations. *Diabetes* 57:3112-3121, 2008
142. Vaxillaire M, Veslot J, Dina C, Proenca C, Cauchi S, Charpentier G, Tichet J, Fumeron F, Marre M, Meyre D, Balkau B, Froguel P: Impact of common type 2 diabetes risk polymorphisms in the DESIR prospective study. *Diabetes* 57:244-254, 2008
143. Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S, Balkau B, Heude B, Charpentier G, Hudson TJ, Montpetit A, Pshezhetsky AV, Prentki M, Posner BI, Balding DJ, Meyre D, Polychronakos C, Froguel P: A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 445:881-885, 2007
144. Bouatia-Naji N, Rocheleau G, Van Lommel L, Lemaire K, Schuit F, Cavalcanti-Proenca C, Marchand M, Hartikainen AL, Sovio U, De Graeve F, Rung J, Vaxillaire M, Tichet J, Marre M, Balkau B, Weill J, Elliott P, Jarvelin MR, Meyre D, Polychronakos C, Dina C, Sladek R, Froguel P: A polymorphism within the G6PC2 gene is associated with fasting plasma glucose levels. *Science* 320:1085-1088, 2008
145. Meyre D, Delplanque J, Chevre JC, Lecoecur C, Lobbens S, Gallina S, Durand E, Vatin V, Degraeve F, Proenca C, Gaget S, Korner A, Kovacs P, Kiess W, Tichet J, Marre M, Hartikainen AL, Horber F, Potoczna N, Hercberg S, Levy-Marchal C, Pattou F, Heude B, Tauber M, McCarthy MI, Blakemore AI, Montpetit A, Polychronakos C, Weill J, Coin LJ, Asher J, Elliott P, Jarvelin MR, Visvikis-Siest S, Balkau B, Sladek R, Balding D, Walley A, Dina C, Froguel P: Genome-wide association study for early-onset and morbid adult obesity identifies three new risk loci in European populations. *Nat Genet* 41:157-159, 2009
146. Knutsson A, Akerstedt T, Jonsson BG, Orth-Gomer K: Increased risk of ischaemic heart disease in shift workers. *Lancet* 2:89-92, 1986
147. Kroenke CH, Spiegelman D, Manson J, Schernhammer ES, Colditz GA, Kawachi I: Work characteristics and incidence of type 2 diabetes in women. *Am J Epidemiol* 165:175-183, 2007
148. Scheer FA, Hilton MF, Mantzoros CS, Shea SA: Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:4453-4458, 2009
149. Cappuccio FP, D'Elia L, Strazzullo P, Miller MA: Quantity and quality of sleep and incidence of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care* 33:414-420
150. Peschke E: Melatonin, endocrine pancreas and diabetes. *J Pineal Res* 44:26-40, 2008
151. Zanquetta MM, Seraphim PM, Sumida DH, Cipolla-Neto J, Machado UF: Calorie restriction reduces pinealectomy-induced insulin resistance by improving GLUT4 gene expression and its translocation to the plasma membrane. *J Pineal Res* 35:141-148, 2003
152. de Lima LM, dos Reis LC, de Lima MA: Influence of the pineal gland on the physiology, morphometry and morphology of pancreatic islets in rats. *Braz J Biol* 61:333-340, 2001

153. Peschke E, Frese T, Chankiewitz E, Peschke D, Preiss U, Schneyer U, Spessert R, Muhlbauer E: Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin-receptor status. *J Pineal Res* 40:135-143, 2006
154. Mulder H, Nagorny CL, Lyssenko V, Groop L: Melatonin receptors in pancreatic islets: good morning to a novel type 2 diabetes gene. *Diabetologia* 52:1240-1249, 2009
155. Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowski T, Bubenik GA: Role of melatonin in upper gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol* 58 Suppl 6:23-52, 2007
156. Bouatia-Naji N, Bonnefond A, Cavalcanti-Proenca C, Sparso T, Holmkvist J, Marchand M, Delplanque J, Lobbens S, Rocheleau G, Durand E, De Graeve F, Chevre JC, Borch-Johnsen K, Hartikainen AL, Ruokonen A, Tichet J, Marre M, Weill J, Heude B, Tauber M, Lemaire K, Schuit F, Elliott P, Jorgensen T, Charpentier G, Hadjadj S, Cauchi S, Vaxillaire M, Sladek R, Visvikis-Siest S, Balkau B, Levy-Marchal C, Pattou F, Meyre D, Blakemore AI, Jarvelin MR, Walley AJ, Hansen T, Dina C, Pedersen O, Froguel P: A variant near MTNR1B is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk. *Nat Genet* 41:89-94, 2009
157. Prokopenko I, Langenberg C, Florez JC, Saxena R, Soranzo N, Thorleifsson G, Loos RJ, Manning AK, Jackson AU, Aulchenko Y, Potter SC, Erdos MR, Sanna S, Hottenga JJ, Wheeler E, Kaakinen M, Lyssenko V, Chen WM, Ahmadi K, Beckmann JS, Bergman RN, Bochud M, Bonnycastle LL, Buchanan TA, Cao A, Cervino A, Coin L, Collins FS, Crisponi L, de Geus EJ, Dehghan A, Deloukas P, Doney AS, Elliott P, Freimer N, Gateva V, Herder C, Hofman A, Hughes TE, Hunt S, Illig T, Inouye M, Isomaa B, Johnson T, Kong A, Krestyaninova M, Kuusisto J, Laakso M, Lim N, Lindblad U, Lindgren CM, McCann OT, Mohlke KL, Morris AD, Naitza S, Orru M, Palmer CN, Pouta A, Randall J, Rathmann W, Saramies J, Scheet P, Scott LJ, Scuteri A, Sharp S, Sijbrands E, Smit JH, Song K, Steinthorsdottir V, Stringham HM, Tuomi T, Tuomilehto J, Uitterlinden AG, Voight BF, Waterworth D, Wichmann HE, Willemsen G, Witteman JC, Yuan X, Zhao JH, Zeggini E, Schlessinger D, Sandhu M, Boomsma DI, Uda M, Spector TD, Penninx BW, Altshuler D, Vollenweider P, Jarvelin MR, Lakatta E, Waeber G, Fox CS, Peltonen L, Groop LC, Mooser V, Cupples LA, Thorsteinsdottir U, Boehnke M, Barroso I, Van Duijn C, Dupuis J, Watanabe RM, Stefansson K, McCarthy MI, Wareham NJ, Meigs JB, Abecasis GR: Variants in MTNR1B influence fasting glucose levels. *Nat Genet* 41:77-81, 2009
158. Lyssenko V, Nagorny CL, Erdos MR, Wierup N, Jonsson A, Spiegel P, Bugliani M, Saxena R, Fex M, Pulizzi N, Isomaa B, Tuomi T, Nilsson P, Kuusisto J, Tuomilehto J, Boehnke M, Altshuler D, Sundler F, Eriksson JG, Jackson AU, Laakso M, Marchetti P, Watanabe RM, Mulder H, Groop L: Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. *Nat Genet* 41:82-88, 2009
159. Watanabe RM: The genetics of insulin resistance: Where's Waldo? *Curr Diab Rep* 10:476-484
160. Miyawaki K, Yamada Y, Yano H, Niwa H, Ban N, Ihara Y, Kubota A, Fujimoto S, Kajikawa M, Kuroe A, Tsuda K, Hashimoto H, Yamashita T, Jomori T, Tashiro F, Miyazaki J, Seino Y: Glucose intolerance caused by a defect in the entero-insular axis: a study in gastric inhibitory polypeptide receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14843-14847, 1999
161. Panzer S, Kronik G, Lechner K, Bettelheim P, Neumann E, Dudczak R: Glycosylated hemoglobins (GHb): an index of red cell survival. *Blood* 59:1348-1350, 1982
162. Cohen RM, Franco RS, Khera PK, Smith EP, Lindsell CJ, Ciruolo PJ, Palascak MB, Joiner CH: Red cell life span heterogeneity in hematologically normal people is sufficient to alter HbA1c. *Blood* 112:4284-4291, 2008

163. Cohen RM, Smith EP: Frequency of HbA1c discordance in estimating blood glucose control. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 11:512-517, 2008
164. Roberts WL, Safar-Pour S, De BK, Rohlfing CL, Weykamp CW, Little RR: Effects of hemoglobin C and S traits on glycohemoglobin measurements by eleven methods. *Clin Chem* 51:776-778, 2005
165. Soranzo N, Sanna S, Wheeler E, Gieger C, Radke D, Dupuis J, Bouatia-Naji N, Langenberg C, Prokopenko I, Stolerman E, Sandhu MS, Heeney MM, Devaney JM, Reilly MP, Ricketts SL, Stewart AF, Voight BF, Willenborg C, Wright B, Altshuler D, Arking D, Balkau B, Barnes D, Boerwinkle E, Boehm B, Bonnefond A, Bonnycastle LL, Boomsma DI, Bornstein SR, Bottcher Y, Bumpstead S, Burnett-Miller MS, Campbell H, Cao A, Chambers J, Clark R, Collins FS, Coresh J, de Geus EJ, Dei M, Deloukas P, Doring A, Egan JM, Elosua R, Ferrucci L, Forouhi N, Fox CS, Franklin C, Franzosi MG, Gallina S, Goel A, Graessler J, Grallert H, Greinacher A, Hadley D, Hall A, Hamsten A, Hayward C, Heath S, Herder C, Homuth G, Hottenga JJ, Hunter-Merrill R, Illig T, Jackson AU, Jula A, Kleber M, Knouff CW, Kong A, Kooner J, Kottgen A, Kovacs P, Krohn K, Kuhnel B, Kuusisto J, Laakso M, Lathrop M, Lecoeur C, Li M, Li M, Loos RJ, Luan J, Lyssenko V, Magi R, Magnusson PK, Malarstig A, Mangino M, Martinez-Larrad MT, Marz W, McArdle WL, McPherson R, Meisinger C, Meitinger T, Melander O, Mohlke KL, Mooser VE, Morken MA, Narisu N, Nathan DM, Nauck M, O'Donnell C, Oexle K, Olla N, Pankow JS, Payne F, Peden JF, Pedersen NL, Peltonen L, Perola M, Polasek O, Porcu E, Rader DJ, Rathmann W, Ripatti S, Rocheleau G, Roden M, Rudan I, Salomaa V, Saxena R, Schlessinger D, Schunkert H, Schwarz P, Seedorf U, Selvin E, Serrano-Rios M, Shrader P, Silveira A, Siscovick D, Song K, Spector TD, Stefansson K, Steinthorsdottir V, Strachan DP, Strawbridge R, Stumvoll M, Surakka I, Swift AJ, Tanaka T, Teumer A, Thorleifsson G, Thorsteinsdottir U, Tonjes A, Usala G, Vitart V, Volzke H, Wallaschofski H, Waterworth DM, Watkins H, Wichmann HE, Wild SH, Willemsen G, Williams GH, Wilson JF, Winkelmann J, Wright AF, Zabena C, Zhao JH, Epstein SE, Erdmann J, Hakonarson HH, Kathiresan S, Khaw KT, Roberts R, Samani NJ, Fleming MD, Sladek R, Abecasis G, Boehnke M, Froguel P, Groop L, McCarthy MI, Kao WH, Florez JC, Uda M, Wareham NJ, Barroso I, Meigs JB: Common variants at ten genomic loci influence hemoglobin A1C levels via glycemic and non-glycemic pathways. *Diabetes*
166. Pare G, Chasman DI, Parker AN, Nathan DM, Miletich JP, Zee RY, Ridker PM: Novel association of HK1 with glycosylated hemoglobin in a non-diabetic population: a genome-wide evaluation of 14,618 participants in the Women's Genome Health Study. *PLoS Genet* 4:e1000312, 2008
167. Peters LL, Lane PW, Andersen SG, Gwynn B, Barker JE, Beutler E: Downeast anemia (dea), a new mouse model of severe nonspherocytic hemolytic anemia caused by hexokinase (HK(1)) deficiency. *Blood Cells Mol Dis* 27:850-860, 2001
168. Ganesh SK, Zakai NA, van Rooij FJ, Soranzo N, Smith AV, Nalls MA, Chen MH, Kottgen A, Glazer NL, Dehghan A, Kuhnel B, Aspelund T, Yang Q, Tanaka T, Jaffe A, Bis JC, Verwoert GC, Teumer A, Fox CS, Guralnik JM, Ehret GB, Rice K, Felix JF, Rendon A, Eiriksdottir G, Levy D, Patel KV, Boerwinkle E, Rotter JJ, Hofman A, Sambrook JG, Hernandez DG, Zheng G, Bandinelli S, Singleton AB, Coresh J, Lumley T, Uitterlinden AG, Vangils JM, Launer LJ, Cupples LA, Oostra BA, Zwaginga JJ, Ouwehand WH, Thein SL, Meisinger C, Deloukas P, Nauck M, Spector TD, Gieger C, Gudnason V, van Duijn CM, Psaty BM, Ferrucci L, Chakravarti A, Greinacher A, O'Donnell CJ, Witteman JC, Furth S, Cushman M, Harris TB, Lin JP: Multiple loci influence erythrocyte phenotypes in the CHARGE Consortium. *Nat Genet* 41:1191-1198, 2009
169. Dogra RS, Vaidyanathan P, Prabakar KR, Marshall KE, Hutton JC, Pugliese A: Alternative splicing of G6PC2, the gene coding for the islet-specific glucose-6-phosphatase

catalytic subunit-related protein (IGRP), results in differential expression in human thymus and spleen compared with pancreas. *Diabetologia* 49:953-957, 2006

170. Garin I, Edghill EL, Akerman I, Rubio-Cabezas O, Rica I, Locke JM, Maestro MA, Alshaikh A, Bundak R, del Castillo G, Deeb A, Deiss D, Fernandez JM, Godbole K, Hussain K, O'Connell M, Klupa T, Kolouskova S, Mohsin F, Perlman K, Sumnik Z, Rial JM, Ugarte E, Vasanthi T, Johnstone K, Flanagan SE, Martinez R, Castano C, Patch AM, Fernandez-Rebollo E, Raile K, Morgan N, Harries LW, Castano L, Ellard S, Ferrer J, Perez de Nanclares G, Hattersley AT: Recessive mutations in the INS gene result in neonatal diabetes through reduced insulin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:3105-3110

171. Neve B, Fernandez-Zapico ME, Ashkenazi-Katalan V, Dina C, Hamid YH, Joly E, Vaillant E, Benmezroua Y, Durand E, Bakaher N, Delannoy V, Vaxillaire M, Cook T, Dallinga-Thie GM, Jansen H, Charles MA, Clement K, Galan P, Hercberg S, Helbecque N, Charpentier G, Prentki M, Hansen T, Pedersen O, Urrutia R, Melloul D, Froguel P: Role of transcription factor KLF11 and its diabetes-associated gene variants in pancreatic beta cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:4807-4812, 2005

172. Nejentsev S, Walker N, Riches D, Egholm M, Todd JA: Rare variants of IFIH1, a gene implicated in antiviral responses, protect against type 1 diabetes. *Science* 324:387-389, 2009