



HAL
open science

Etude du rôle du gène PROX1 dans le diabète de type 2

Sophie Lecompte

► **To cite this version:**

Sophie Lecompte. Etude du rôle du gène PROX1 dans le diabète de type 2. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2012. Français. NNT : 2012LIL2S021 . tel-00790524

HAL Id: tel-00790524

<https://theses.hal.science/tel-00790524>

Submitted on 20 Feb 2013

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.

UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE LILLE 2

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE
en Sciences de la Vie et de la Santé

Etude du rôle du gène *PROX1* dans le diabète de type 2

Soutenue publiquement le 4 décembre 2012 par

Sophie LECOMPTE

Devant le jury composé de :

Monsieur le Docteur Frédéric Fumeron

Rapporteur

Monsieur le Docteur Bertrand Blondeau

Rapporteur

Madame le Docteur Beverley Balkau

Examineur

Monsieur le Professeur Amar Abderrahmani

Examineur

Madame le Docteur Aline Meirhaeghe

Directrice de thèse

Monsieur le Professeur Philippe Amouyel

Directeur du laboratoire

Unité INSERM U744 – Institut Pasteur de Lille

*A Maxim,
A mes parents,
A ma sœur,
A mes grands-parents,*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier sincèrement :

Monsieur le Professeur Philippe Amouyel pour m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire et pour m'avoir donné les moyens de mener à bien mon projet. Je vous en suis très reconnaissante.

Madame le Docteur Aline Meirhaeghe pour m'avoir confié ce projet et donné la chance de réaliser ma thèse dans des conditions excellentes. Je tiens très sincèrement à te remercier de m'avoir guidée durant ces années et d'avoir partagé tes connaissances avec moi. Merci beaucoup pour ta gentillesse et ta générosité, pour ton aide et tes précieux conseils. J'espère que nous aurons l'occasion de collaborer ensemble par la suite.

Monsieur le Docteur Bertrand Blondeau, par l'honneur que vous me faites en acceptant d'être le rapporteur de cette thèse. Veuillez y trouver l'expression de ma très haute estime et mes remerciements les plus sincères.

Monsieur le Docteur Frédéric Fumeron pour avoir accepté d'être le rapporteur de ma thèse et d'avoir consacré du temps pour juger ce travail. Je vous prie de croire en mon profond respect.

Madame le Docteur Beverley Balkau de m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury. J'apprécie l'intérêt que vous avez porté à ce travail.

Monsieur le Professeur Amar Abderrahmani pour avoir accepté de juger mon travail et d'apporter votre regard critique.

Je tiens à remercier tout particulièrement les personnes de mon équipe :

Jean Dallongeville pour tes arrivées surprises et ton regard critique et constructif sur mes travaux!

Julie Dumont pour avoir accepté de partager ton bureau avec moi et surtout pour tes nombreux conseils et ton soutien.

Louisa Goumidi pour ta joie de vivre, nos petites discussions et surtout pour ton soutien très important.

Xavier Hermant pour ton aide précieuse pour les manipulations, ta relecture du manuscrit et ta grande gentillesse.

Gianni Pasquetti pour ton aide pour les manipulations.

Je tiens à remercier toutes les personnes que j'ai eu l'occasion de côtoyer durant ces 4 années au sein de l'unité INSERM U744 de l'Institut Pasteur, en particulier :

Anne-Sophie Delbart pour nos discussions sur la Corse et mes commandes souvent passées en urgence.

Anne-Marie Ayrat pour tes précieux conseils techniques, notamment en culture cellulaire.

Jean-Charles Lambert pour ta sympathie et tes conseils.

Franck Hansmannel pour ton humour (parfois tordu) et tes conseils.

Benjamin Grenier-Boley pour ton aide très précieuse en statistiques et en informatique.

Nadine Marécaux, ton aide logistique m'a été très précieuse. Merci pour la mise en forme (pas toujours facile) de cette thèse.

Marie Pigeyre, merci pour ta relecture du manuscrit et tes conseils d'endocrinologue.

Mais également, Bart Dermaut, Pierre Dourlen, Céline Bellenguez, Julien Chapuis, Valérie Codron, Cloé Dupont, Florence Pinet, Maggy Chwastyniak, Olivia Beseme, Rafaëlle Spear, Marie Fertin, Annie Turkieh, Chantal Steclebout, les infirmières et les médecins des études épidémiologiques, pour votre soutien et vos encouragements tout au long de ma thèse.

J'en profite également pour remercier les personnes avec lesquelles j'ai collaboré :

L'unité INSERM U1011 (Lille), notamment Iuliana Ristea pour ton aide en culture cellulaire et Bruno Derudas pour ton aide technique en q-PCR.

L'unité INSERM U1062 (Marseille), notamment Patrick Borel.

Le laboratoire d'Études Transcriptomiques et de Génomique Appliquée de l'Institut Pasteur de Lille, en particulier David Hot et Renaud Blervaque, pour avoir réalisé les analyses transcriptomiques et pour votre aide dans l'analyse des données.

Un grand merci tout particulier aux étudiants dont la plupart sont devenus une véritable bande de potes!! Je n'oublierai jamais tous les moments passés ensemble, ces folles soirées, ces petits week-ends déjantés!! J'espère vraiment qu'on se retrouvera plus tard...

Tout d'abord je me devais de commencer par Emilie Deruy, notre ancêtre à tous, merci de m'avoir montré la voie et surtout pour ton soutien durant mon master 2!! Je te souhaite

beaucoup de bonheur avec Emeric !

Ludovic Boytard, notre organisateur officiel de cinés et de soirées en tout genre, merci pour tes conseils sur les films et les séries télé à ne pas manquer. Tu m'auras permis de remonter mon niveau de culture cinématographique ! Et surtout bon courage pour ta thèse! La délivrance est proche...

Florent Letronne, merci pour ta joie de vivre inépuisable, tu as amené beaucoup de joie dans ce labo et je n'oublierai jamais tes gros délires! Bon courage pour cette dernière année de thèse !

Anaïs Mounier, ma voisine de bureau pendant 3 ans ! Nous nous sommes très vite bien entendues, normal en étant nées le même jour. Je te souhaite également bon courage pour ta thèse et ton post-doc, mais surtout évite de rigoler dans ton thé !

Merci également à Marion Bouvet, je n'oublierai jamais nos longues discussions et nos rencontres incroyables dans le train! Merci d'avoir été une confidente dans les bons et les mauvais moments ! Je te souhaite beaucoup de courage pour la suite de ta thèse!!

Amandine Flaig et Florie Demiautte, merci pour votre bonne humeur, nos délires et pour vos conseils beauté!

Justine Burdèse, tu auras amené beaucoup de folie durant ton année passée parmi nous !

Fancy Geller, merci pour nos fous rires, je te souhaite beaucoup de joie avec ton petit Noam.

Merci également à Aude Belliard et Yoann Sottejeau pour leur sympathie et leur enthousiasme, je vous souhaite beaucoup de bonheur avec votre petit Loïs!

Enfin, merci à tous les étudiants même s'ils n'étaient parfois que de passage : Lionel Ovar, Marine Senez, Vincent Chouraki (bon courage pour ta thèse !), Vanessa Legry, Geoffroy Laumet, Adelina Acosta-Martin, Florian Gillet, Julie Dehon, Hélène Herdier, Melissa Alame, Houssam Boulenouar, Clémence Raptin.

Pour finir, mes pensées vont à ma famille.

A mes parents tout d'abord car c'est avec eux que tout commence! Merci pour votre amour, votre soutien et votre confiance. Merci aussi de m'avoir donné la chance de pouvoir faire ce que je voulais dans la vie. Je suis fière d'avoir des parents comme vous...

A ma sœur et mon beau-frère également, vous m'avez donné deux magnifiques neveux dont je suis très fière. Audrey, tu as toujours été un exemple pour moi, j'ai beaucoup de chance d'avoir une sœur comme toi. Merci d'avoir toujours été là pour me soutenir dans les moments difficiles.

Enfin mes pensées se tournent vers Maxim, ton amour et ton soutien m'ont permis d'aller jusqu'au bout de cette aventure...merci de prendre autant soin de moi! Maintenant, c'est une nouvelle vie qui nous attend...

Résumé

Etude du rôle du gène *PROX1* dans le diabète de type 2

PROX1 étant un facteur de susceptibilité au diabète de type 2 (DT2), nous avons réalisé des études génétiques et moléculaires afin de comprendre son rôle dans l'étiologie du DT2.

Nous avons analysé l'impact de 80 SNPs de *PROX1* sur des phénotypes cliniques associés au DT2 dans l'étude HELENA (n=1155 adolescents) et montré que trois SNPs (rs340838, rs340837 et rs340836) sont associés à l'insulinémie à jeun. Nous avons évalué la fonctionnalité de 9 SNPs (les 3 SNPs associés et 6 SNPs en déséquilibre de liaison) en utilisant un gène rapporteur Luciférase dans des cellules HepG2 et MIN6. Les allèles associés à la diminution de l'insulinémie des SNPs rs340874, rs340873 et rs340835 sont associés à une diminution de l'expression du gène rapporteur Luciférase, suggérant que l'expression de *PROX1* est diminuée chez les individus porteurs des allèles à risque.

Nous avons aussi montré que l'inhibition de l'expression de *Prox1* par siRNAs dans les cellules INS-1E engendrait une diminution de 1,7 fois de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et qu'une concentration élevée en glucose modulait positivement l'expression de la protéine *Prox1*.

Des analyses transcriptomiques réalisées dans les cellules INS-1E ont permis de montrer que certains des gènes cibles de *PROX1* dans les cellules bêta sont des gènes impliqués dans des voies de sécrétion d'insuline.

Enfin, nous avons également observé que l'agoniste de PPARgamma, la troglitazone, diminuait l'expression de *Prox1* dans les cellules INS-1E.

Ces résultats suggèrent qu'une altération de l'expression de *Prox1* par des variants cis-régulateurs pourrait conduire à une sécrétion d'insuline en réponse au glucose altérée des cellules bêta, conférant ainsi une susceptibilité au DT2.

Mots clés : Diabète de type 2, *PROX1*, insuline, polymorphisme, GWAS, PPARs, analyses transcriptomiques, cellules MIN6, cellules HepG2, cellules INS-1E, sécrétion d'insuline en réponse au glucose.

Abstract

Study of the role of the *PROX1* gene in type 2 diabetes

As *PROX1* is a susceptibility factor for type 2 diabetes (T2D), we conducted genetic and molecular studies to better understand the role of *PROX1* in the etiology of T2D.

We assessed the impact of 80 *PROX1* SNPs on T2D-related biochemical traits in the HELENA study (n=1155 adolescents) and showed that 3 SNPs (rs340838, rs340837 and rs340836) were significantly associated with fasting plasma insulin levels. We evaluated the functional impact of 9 SNPs (the 3 insulin-associated SNPs plus 6 SNPs in linkage disequilibrium) using a Luciferase reporter gene expression in HepG2 and MIN6 cells. The insulin-lowering alleles of the rs340874, rs340873 and rs340835 SNPs were associated with lower Luciferase gene expression, suggesting that *PROX1* expression may be lower in individuals carrying the insulin-lowering alleles.

We also showed that the knock-down of *Prox1* expression by siRNA in INS-1E cells resulted in a 1.7 fold reduced glucose-stimulated insulin secretion and that high concentrations of glucose positively modulated *Prox1* protein expression.

Then, microarray analyses performed in INS-1E cells showed that some *PROX1* target genes in the β cells are implicated in insulin secretion pathways.

Finally, we observed that the PPAR γ agonist, the troglitazone, decreased *Prox1* expression in INS-1E cells.

Altogether, these results suggest that an altered expression of *Prox1* by cis-regulators variants results in an altered β -cell glucose-stimulated insulin secretion and thereby confers susceptibility to T2D.

Key words : Type 2 diabetes, *PROX1*, insulin, polymorphism, GWAS, PPARs, microarray, MIN6 cells, HepG2 cells, INS-1E cells, GSIS.

Liste des publications

Ce travail de thèse a donné lieu aux publications suivantes :

Lecompte S., Szabo de Edelenyi F., Goumidi L., Maiani G., Moschonis G., Widhalm K., Molnár D., Kafatos A., Spinneker A., Breidenassel C., Dallongeville J., Meirhaeghe A., and Borel P. (2011) Polymorphisms in the *CD36/FAT* gene are associated with plasma vitamin E levels in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **93**, 1-8.

***Lecompte S.**, Pasquetti G., Hermant X., Grenier-Boley B., Gonzalez-Gross M., De Henauw S., Molnar D., Stehle P., Béghin L., Moreno L.A., Amouyel P., Dallongeville J., Meirhaeghe A. Genetic and molecular insights into the role of PROX1 in glucose metabolism. *Diabetes* (Sous presse).

Borel P., Lietz G., Goncalves A., Szabo de Edelenyi F., **Lecompte S.**, Curtis P., Goumidi L., Caslake M.J., Miles E.A., Packard C., Calder P.C., Mathers J.C., Minihane A.M., Tourniaire F., Kesse-Guyot E., Galan P, Hercberg S, Breidenassel C., González Gross M., Moussa M., Meirhaeghe A., Reboul E. Both CD36 and SR-BI are involved in cellular uptake of provitamin A carotenoids, and genetic variants in their encoding genes are associated with plasma concentrations of these micronutrients. *J. Nutr.* (soumis).

* Publication présentée dans la thèse.

Liste des communications

Lecompte S., Szabo de Edelenyi F., Goumidi L., Maiani G., Manios Y., Widhalm K., Molnár D., Kafatos A., Breidenassel C., Dallongeville J., Meirhaeghe A., Borel P. Genetic polymorphisms in *CD36* are associated with blood concentrations of vitamin E in humans. Présenté durant :

- le congrès de la Nouvelle Société Française d'Athérosclérose à Biarritz du 9 au 12 juin 2010.

- les Journées Francophones de la Nutrition à Lille du 8 au 10 décembre 2010.

Lecompte S., Gonzalez-Gross M., Moreno L.A., Dallongeville J., Amouyel P., Meirhaeghe A. Des polymorphismes du gène *PROX1* sont associés au risque de développer un diabète de type 2 et au contrôle glycémique chez les adultes et les adolescents.

Présenté durant la Journée André Verbert à Lille le 15 septembre 2011.

Lecompte S., Gonzalez-Gross M., DeHenauw S., Molnar D, Stehle P., Béghin L., Moreno L.A., Dallongeville J., Amouyel P., Meirhaeghe A. Association between *PROX1* gene polymorphisms and glucose-related traits in French adults and European adolescents and implication of *PROX1* in the glycemic control in pancreatic beta cells.

Présenté durant le congrès Diabetes UK Professional Conference du 7 au 9 mars 2012 à Glasgow (Ecosse).

Table des matières

Table des matières	10
Liste des abréviations	14
Introduction.....	19
I. Généralités sur le diabète	19
1. Définition générale	19
2. Histoire du diabète	19
3. Définitions des différents types de diabète	20
II. Epidémiologie du diabète de type 2.....	23
1. Prévalence en France et dans le monde	23
a. Prévalence selon le sexe	26
b. Prévalence selon l'âge.....	27
c. Cas des enfants et des adolescents	28
d. Prévalence selon les ethnies	30
2. Morbidité et mortalité associées au diabète de type 2	31
III. Diagnostic clinique du diabète de type 2.....	32
1. Symptômes et diagnostic du diabète de type 2.....	32
2. Facteurs de risque du diabète de type 2.....	33
a. Facteurs environnementaux	33
b. Facteurs génétiques	36
IV. Régulation de la glycémie	36
1. Organes impliqués dans la régulation de la glycémie	37
a. Le pancréas	37
i. Sa composition.....	37
ii. La cellule β -pancréatique.....	39
b. Les autres organes impliqués dans la régulation de la glycémie	39
2. Régulation nerveuse de la glycémie	40
3. Hormones hyperglycémiantes.....	41
4. L'insuline : la seule hormone hypoglycémiante.....	42
a. Description de l'insuline	42
b. Rôle de l'insuline.....	44
c. Régulation de la sécrétion d'insuline.....	46

i. Rôle du glucose.....	46
ii. Stimulateurs et atténuateurs de la sécrétion d'insuline.....	48
5. Troubles de la glycémie	53
a. Résistance à l'insuline ou insulino-résistance.....	53
b. Troubles de l'insulino-sécrétion	55
V. Complications du diabète de type 2.....	57
1. Complications aiguës.....	58
2. Complications chroniques.....	59
a. Glucotoxicité	59
i. Espèces réactives de l'oxygène (ROS)	59
ii. Produits avancés de glycation (AGEs)	60
iii. Voie du polyol	61
iv. Conséquences de la glucotoxicité	62
b. Complications microvasculaires.....	62
c. Complications macrovasculaires.....	63
VI. Principe des études génétiques.....	65
1. Polymorphismes	65
2. Déséquilibre de liaison	66
3. Haplotypes.....	67
4. Tag-SNPs	68
5. Analyses statistiques	70
a. Equilibre d'Hardy Weinberg	70
b. Analyses statistiques utilisées dans les études d'association.....	71
c. Facteurs de confusion et interactions.....	72
VII. Gènes de susceptibilité au diabète de type 2	74
1. Etudes d'analyse de liaison et études d'associations gène-candidat.....	74
2. Etudes d'association génome entier ou "Genome Wide Association Studies"	75
a. Qu'est-ce qu'une étude GWA ?	75
b. Etudes GWA sur le diabète de type 2.....	76
c. Etudes GWA sur les traits quantitatifs glycémiques	77
d. Limites et perspectives des GWAS.....	80
i. Limites des GWAS	80
ii. Perspectives des GWAS	82
VIII. Choix d'un gène de susceptibilité au diabète de type 2 : PROX1	83

1. Description du gène <i>PROX1</i>	83
2. Fonctions de <i>PROX1</i>	85
a. Rôle de <i>PROX1</i> dans les vaisseaux lymphatiques	85
b. Rôle de <i>PROX1</i> dans le pancréas	86
c. Rôle de <i>PROX1</i> dans le foie	87
d. Rôle de <i>PROX1</i> dans les autres organes	88
i. Dans le cœur	88
ii. Dans le système nerveux central.....	88
iii. Dans l'œil.....	89
iv. Dans le cancer.....	89
3. Gènes cibles de <i>PROX1</i>	90
4. Régulation de l'expression de <i>PROX1</i>	91
Matériels et méthodes	92
I. Etudes d'associations génétiques de <i>PROX1</i>	92
1. Etude HELENA.....	92
2. Génotypage	95
a. Technologie KASPar.....	95
b. Imputation	96
3. Analyses statistiques	96
II. Etudes de la fonctionnalité moléculaire de <i>PROX1</i>	97
1. Lignées cellulaires	97
a. La lignée β -pancréatique de souris MIN6.....	98
b. La lignée β -pancréatique de rat INS-1E	98
2. Traitement au glucose pendant 24 ou 48h des cellules β -pancréatiques	99
3. Modulation de l'expression de <i>PROX1</i>	99
a. Sur-expression de <i>PROX1</i>	100
b. Sous-expression de <i>PROX1</i>	100
4. Traitements au glucose pendant 1h des cellules β -pancréatiques.....	102
5. Traitements par les agonistes des PPARs.....	103
6. Western blot.....	103
7. Quantitative-PCR (qPCR)	104
8. Retard sur gel	107
9. Analyses transcriptomiques	108

a. Puces à ADN	108
b. Logiciel IPA.....	112
Résultats	114
I. Contexte.....	114
II. Article.....	115
III. Discussion de l'article	116
IV. Autres résultats non publiés	121
1. Étude de la régulation de <i>Prox1</i> par les PPARs dans les cellules INS1-E.....	121
2. Détermination des gènes cibles de PROX1 dans les cellules β -pancréatiques. 126	
a. Résultats et validation des analyses transcriptomiques.....	127
b. Etudes des voies canoniques dans IPA.....	131
c. Etudes des fonctions biologiques dans IPA	133
Discussion générale/Perspectives.....	137
I. Discussion sur l'étude génétique	137
II. Discussion sur les études moléculaires et cellulaires	141
III. Perspectives	142
IV. Conclusion générale.....	144
Bibliographie.....	145

Liste des abréviations

AA	Acides Aminés
AC	Adénylate Cyclase
Acétyl-CoA	Acétyl-Coenzyme A
ADA	American Diabetes Association
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acides DésoxyriboNucléiques complémentaires
AFSSAPS	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
AG	Acides Gras
AGE	Advanced Glycation Endproducts
AGL	Acides Gras Libres
ALFEDIAM	Association de Langue Française pour l'Etude du DIAbète et des maladies Métaboliques
AHA	American Heart Association
AMPc	Adénosine MonoPhospahte cyclique
ANCOVA	ANalysis of COVAriance
ANOVA	ANalysis Of VAriance
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ATP	Adénosine TriPhosphate
BEH	Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire
CAPN10	Calpain-10
CD34	Cluster of Differentiation 34
CD44	Cluster of Differentiation 44
CEL	Cellules Endothéliales Lymphatiques
Chip-on-chip	Chromatin ImmunoPrecipitation on Chip
CNV	Copy Number Variation
COUP-TFII	Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor II
Ct	Cycle threshold
CYP7a1	Cholesterol 7-alpha-hydroxylase
DAG	DiAcylGlycerol
DDL	Degré De Liberté
DGI	Diabetes Genetics Initiative

DIAGRAM	DIAbetes Genetics Replication And Meta-analysis
DIG	Digoxygénine
DL	Déséquilibre de Liaison
DMEM-Glutamax	Dulbecco's Modified Eagle Medium-Glutamax
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
DOM	Département d'Outre-Mer
DT1	Diabète de Type 1
DT2	Diabète de Type 2
EGF	Epidermal Growth Factor
ERR- α	Estrogen-Related Receptor- α
Ff1b	Fushi tarazu Factor 1b
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR-3	Fibroblast Growth Factor Receptor-3
FID	Fédération Internationale du Diabète
FRET	Fluorescent Resonance Energy Transfer
FSIVGTT	Frequently Sampled IntraVenous Glucose Tolerance Test
FUSION	Finland-United States Investigation of NIDDM
GCG	Glucagon
GCGR	Glucagon Receptor
GH	Growth Hormone
GIP	Gastric Inhibitory Polypeptide
GLP-1	Glucagon-Like Peptide-1
GLUT	GLUcose Transporter
GRP	Gastrin Releasing Peptide
GWAS	Genome-Wide Association Study
HAS	Haute Autorité en Santé
HAECs	Human Aortic Endothelial Cells
Hba1c	Hémoglobine glycosylée a 1c
HDL-cholesterol	High-Density Lipoprotein-cholesterol
HELENA	HEalthy Lifestyle in Europe by Nutrition in Adolescence
HGPO	HyperGlycémie Provoquée par voie Orale
HMM	Hidden Markov Models
HNF1 α	Hepatocyte Nuclear Factor 1 α
HNF4 α	Hepatocyte Nuclear Factor 4 α

HOMA-B	HOMeostasie Model Assesment- β -cell function
HOMA-IR	HOMeostasie Model Assesment-Insulin Resistance
HTA	HyperTension Artérielle
IAPP	Islet Amyloid PolyPeptide
IG	Intolérance au Glucose
IGF-1	Insulin Growth Factor-1
IMC	Indice de Masse Corporelle
iNOS	inductible Nitric Oxide Synthase
InVS	Institut national de Veille Sanitaire
IP3	Inositol 3 Phosphate
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
IR	Insulin Receptor
IRS-1	Insulin Receptor Substrate-1
IVGTT	IntraVenous Glucose Tolerance Test
KATP	canaux potassiques ATP-dépendants
KCNJ11	Potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 11
KLF14	Kruppel-Like Factor 14
LDL	Low-Density Lipoproteins
LDS	Lithium Dodecyl Sulfate
LIMMA	Linear Models for MicroArray data
LRH1	Liver Receptor Homolog-1
LYVE-1	LYmphatic Vessel Endothelial hyaluronan receptor-1
MAGIC	Meta-Analysis of Glucose and Insulin-related traits Consortium
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
NES	Nuclear Export Sequence
NHLBI	National Heart Lung and Blood Institute
NLS	Nuclear Localization Sequence
NO	Nitric Oxide
NR	Nuclear Receptor
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OR	Odds Ratio
P	Phosphate
PACAP	Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor type-1

PCR	Polymerase Chain Reaction
PD1	Prospero Domain 1
PD2	Prospero Domain 2
PDX1	Pancreatic Duodenal homeoboX 1
Pepck	Phosphoenolpyruvate carboxykinase
PGC-1 α	Proliferator-activated receptor Gamma Coactivator-1 α
PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PKA	Phospho Kinase A
PLC	Phospholipase C
PNNS	Programme National Nutrition Santé
PPAR	Peroxisome Proliferator Activated Receptor
PPRE	PPAR Response Element
PROX1	PROspero homeoboX 1
QUICKI	QUantitative Insulin-sensitivity CheckK Index
RAGEs	Receptor of Advanced Glycation Endproducts
RAMP1	Receptor Activity-Modifying Protein
RAN	RAs-related Nuclear protein
RCPG	Récepteur Couplé aux Protéines G
RIN	RNA Integrity Number
RISC	RNA Induce Silencing Complex
ROS	Reactive Oxygen Species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RTH	Rapport tour de Taille/tour de Hanche
SF-1	Steroidogenic Factor 1
siCYCLO B	siRNA cyclophiline B
siNT	siRNA Non-Targeting
siPROX1	siRNA PROX1
siRNA	small interfering RNA
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOX18	Sex determining region Y-bOX 18
TBE	Tris-HCL Borate EDTA
TCF7L2	TransCription Factor 7-Like 2
TG	TriGlycérides
TGF- α	Transforming Growth Factor- α

TNT	Tris-base NaCl Tween 20
TSH	Thyroïd Stimulating Hormone
UBD	Ubiquitin Binding Domain
VEGFR-3	Vascular Endothelial cell Growth Factor Receptor-3
VIP	Vasoactive Intestinal Peptide
VLDL	Very Low-Density Lipoprotein
WES	Whole Exome Sequencing
WHO	World Health Organization
WTCCC/UKT2D	Wellcome Trust Case Control Consortium/ United Kingdom Type 2 Diabetes Genetics

Introduction

I. Généralités sur le diabète

1. Définition générale

Le diabète est une maladie métabolique caractérisée par une hyperglycémie chronique. Chez un individu sain, le contrôle de la glycémie se fait par l'insuline, une hormone hypoglycémisante sécrétée par le pancréas. L'insuline permet l'entrée du glucose dans les cellules hépatiques, adipeuses et musculaires afin qu'il soit utilisé comme source d'énergie. Chez les personnes atteintes de diabète, on voit apparaître une diminution, voire une absence totale, de la sécrétion d'insuline conduisant à une augmentation de la glycémie également appelée hyperglycémie. À long terme, si la glycémie n'est pas rétablie (par des traitements, des régimes...), de nombreuses complications apparaîtront, notamment au niveau vasculaire qui, avec le temps, vont provoquer de graves problèmes de santé, en particulier des problèmes cardiovasculaires, rénaux ou encore nerveux.

2. Histoire du diabète

Les premiers textes décrivant le diabète apparaissent entre 2000 et 1500 ans avant J.-C. En Inde, les pères fondateurs de la médecine parlaient d'urine sucrée ou d'urines de miel et précisaient que ces urines attiraient plus particulièrement les mouches et les fourmis. En Chine, les médecins racontaient que les chiens dans la rue étaient attirés par des urines sucrées et en Egypte, le papyrus d'Ebert mentionne une maladie entraînant une soif intense et un dépérissement du corps amenant la mort.

Dans l'antiquité gréco-romaine, Hippocrate reconnaissait les personnes « diabétiques » au grand nombre d'abeilles qui volaient autour des toges des Anciens dont l'entrejambe était probablement imprégné de glucose. Ils avaient également observé que les malades semblaient uriner dès qu'ils venaient de boire, comme s'ils étaient « traversés par l'eau » sans pouvoir la retenir. En grec, « passer au travers » se dit « diabète ».

Dans les années 1700-1800, l'origine digestive du diabète est considérée comme une évidence. Mais c'est à partir de 1815 que des chercheurs vont commencer à s'intéresser de plus près à cette maladie. Plusieurs scientifiques

comme Gay Lussac, Thénard ou Biot, font évaporer de l'urine de diabétiques à partir de laquelle ils recueillent des petits grains blancs sucrés à qui ils donneront, pour la première fois, le nom de « glucose ». Claude Bernard (1813-1878), grâce à ses recherches portant sur la physiologie humaine, montra que le diabète est une perturbation fonctionnelle. Il découvrit la fonction glycogénique du foie et présenta les premières données du métabolisme des hydrates de carbone.

A partir du début du XX^{ème} siècle, les recherches d'un traitement contre le diabète se sont orientées vers la préparation d'un extrait pancréatique utilisable chez l'homme. En 1921, le professeur Nicolas Paulesco mena des expériences sur un chien rendu diabétique. Il démontra que l'injection intraveineuse d'un extrait pancréatique provoquait une diminution de l'hyperglycémie voire même une hypoglycémie. Il ne fit pas d'expériences chez l'homme par peur d'effets secondaires néfastes. La même année, Charles Gardin découvrit qu'un extrait pancréatique de porc, administré par voie veineuse à six personnes, dont quatre diabétiques, faisait baisser la glycémie. Mais c'est au cours de l'été 1921, à Toronto, que Frederick Grant Banting avec l'aide de Charles Best, un étudiant en médecine, et de James Collip, un chimiste, ont mis au point des extraits plus efficaces.

En 1923, l'insuline est obtenue et utilisée comme médicament hypoglycémiant. La même année, les Drs Banting et MacLeod reçoivent le Prix Nobel de physiologie et de médecine pour leurs travaux.

3. Définitions des différents types de diabète

Il existe différents types de diabètes n'ayant pas tous la même origine et ne se soignant donc pas tous de la même façon. En effet, d'après l'ADA (American Diabetes Association), nous pouvons distinguer quatre grands types de diabètes [American Diabetes Association 2012].

Tout d'abord, il existe le diabète de type 1 (DT1), également appelé diabète insulino-dépendant ou diabète juvénile, qui touche plus de 900 000 personnes à travers le monde [Gallagher *et al.* 2011]. Le DT1 est une maladie auto-immune se déclarant le plus souvent au cours de l'enfance ou de l'adolescence. Il est caractérisé par une baisse de la sécrétion d'insuline par le pancréas, voire une absence totale de sécrétion. Les causes d'apparition de cette maladie ne sont toujours pas claires : des chercheurs pensent qu'une prédisposition génétique et certains facteurs liés à l'environnement contribuent au développement du DT1 ce qui

a pour conséquence la destruction de certaines cellules du pancréas par des anticorps [Gallagher *et al.* 2011]. D'autres pensent qu'un virus peut être à l'origine de la maladie et inciterait le système immunitaire à attaquer le pancréas. Comme les cellules du pancréas qui secrètent normalement l'insuline sont détruites, une personne atteinte de DT1 devra recevoir de l'insuline toute sa vie, grâce à des injections quotidiennes par stylo ou par pompe à insuline.

La grande majorité des cas de diabète sont des diabètes de type 2 (DT2) également appelés diabètes non-insulinodépendants ou diabètes de la maturité. Récemment encore, ce type de diabète n'était observé que chez l'adulte mais on l'observe désormais aussi chez l'enfant. Chez une personne atteinte du DT2, on voit apparaître une perte progressive de la sensibilité à l'insuline, ou insulino-résistance, de certains tissus comme le foie, le tissu adipeux ou les muscles. La voie de signalisation de l'insuline va alors être moins activée, réduisant ainsi l'entrée du glucose dans ces organes. Pour compenser cette perte, le pancréas va alors devoir sécréter plus d'insuline ; on parle d'hyperinsulinémie. Avec le temps, le pancréas va s'épuiser et les cellules β -pancréatiques ne vont plus pouvoir sécréter suffisamment d'insuline. Le pancréas ne pourra alors plus compenser la perte de sensibilité à l'insuline, empêchant ainsi l'organisme de réguler correctement la glycémie, ce qui va entraîner une hyperglycémie. Dans un premier temps, une intolérance au glucose (IG) va s'installer ; on parle alors de pré-diabète. Mais par la suite, un dysfonctionnement quasi total des cellules β -pancréatiques va émerger menant, dans un second temps, à une perte du contrôle glycémique ; c'est le début du DT2 (Figure 1). Tabak *et al.* ont montré, dans une étude prospective de 6538 individus britanniques, que 5 ans avant d'être diagnostiquées diabétiques de type 2, les personnes présentaient une forte diminution de la sensibilité à l'insuline, puis une augmentation de la sécrétion d'insuline entre 3 et 4 ans précédant le diagnostic, suivie d'une diminution jusqu'au diagnostic [Tabak *et al.* 2009].

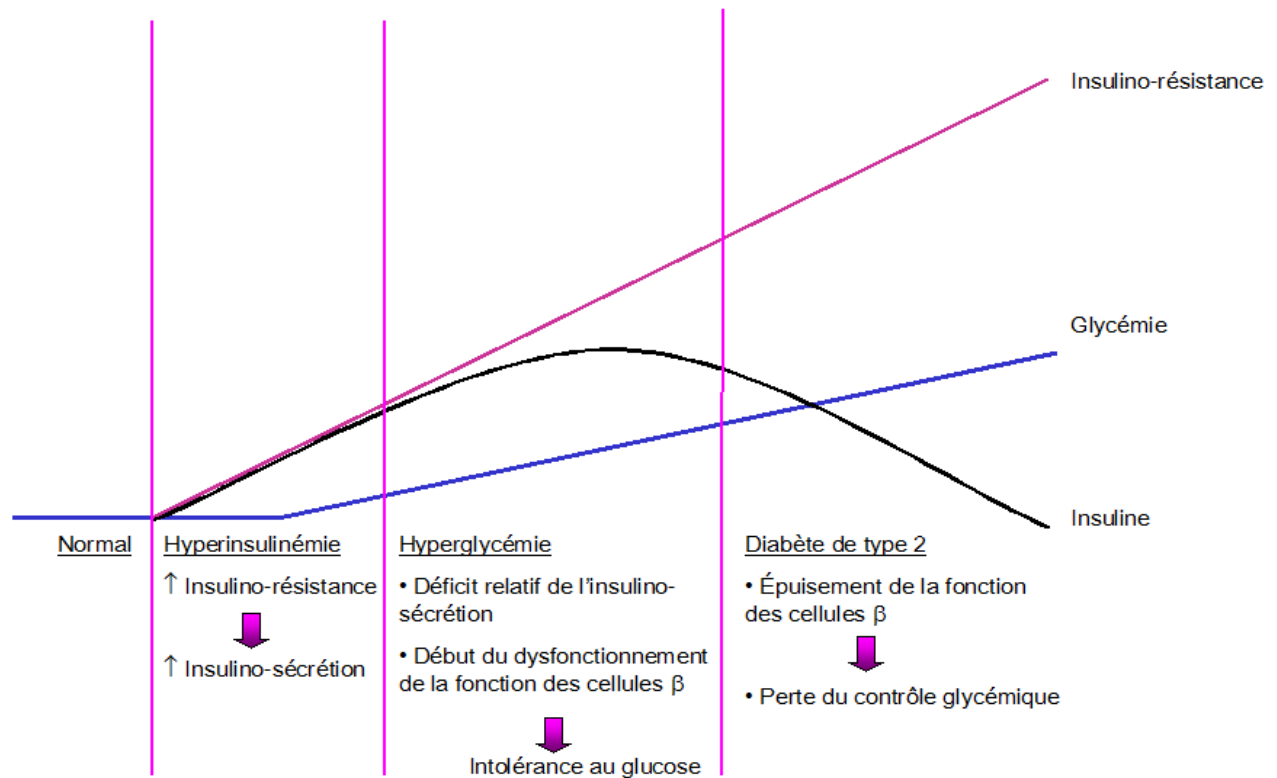


Figure 1 : Evolution du diabète de type 2 au cours du temps.

Le tableau 1 représente les principales caractéristiques cliniques des DT1 et DT2 (Tableau 1).

Tableau 1 : Caractéristiques cliniques des diabètes de type 1 et 2.

	diabète de type 1	diabète de type 2
Age du diagnostic	enfance et adolescence	adulte
Prévalence dans la population diabétique	< 10%	> 90%
Génétique	polygénique	polygénique
Acidocétose	fréquente	rare
Début	rapide, aigu	variable, souvent insidieux
Auto-immunité	présente	absente
Association HLA	oui	non
Obésité	non	fréquente
% de parents avec un diabète	2-4%	80%
Insulinosensibilité	normale	diminuée
Insulinosécrétion	très basse	variable
Insulinothérapie	indispensable	20% des cas
Complications chroniques	- pas avant 5 ans d'évolution - complications à prédominance microangiopathique	- déjà présentes dans 30% des cas au moment du diagnostic - complications à prédominance macroangiopathique

Chez certaines femmes enceintes, suite à l'augmentation de l'insulino-résistance au cours de la grossesse, des cas de diabètes gestationnels peuvent être observés. Ces diabètes peuvent être contractés au cours du 2^{ème} trimestre de grossesse et surviennent chez environ 4% des femmes enceintes mais, contrairement aux DT1 et DT2, ils disparaissent après la naissance du bébé. Cependant, il est essentiel de surveiller les cas de diabètes gestationnels car à long terme, les femmes ayant contracté cette maladie risquent de développer un DT2 (dans 15 à 60% des cas selon les groupes étudiés et la durée du suivi) et les enfants ont un risque plus élevé de souffrir d'obésité, ce qui constitue un facteur de risque de maladies cardiovasculaires et de DT2 [Buchanan *et al.* 2012].

Pour finir, il existe des diabètes dits secondaires correspondant à des formes plus rares de diabète. Ils sont dus à des défauts génétiques des cellules β -pancréatiques (tels que les diabètes de type MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) ou de l'action de l'insuline (tels que le syndrome de Rabson'Mendenhall ou le diabète lipoatrophique), des maladies du pancréas exocrines (telles que la pancréatite, la néoplasie, la fibrose kystique ou encore l'hémochromatose), des endocrinopathies (tels que l'acromégalie, l'hyperthyroïdisme, le syndrome de Cushing), des diabètes induits par des drogues, des produits chimiques ou encore des infections [Alberti *et al.* 1998].

Notre laboratoire s'intéresse plus particulièrement aux maladies liées au vieillissement, c'est pourquoi au cours de ma thèse, je me suis intéressée au DT2 qui est un diabète apparaissant avec l'âge.

II. Epidémiologie du diabète de type 2

1. Prévalence en France et dans le monde

Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) (rapport de septembre 2011), plus de 366 millions de personnes dans le monde sont touchées par le diabète, soit environ 8,3% des adultes, et ce chiffre atteindra plus de 552 millions en 2030 (Figure 2). D'après la Fédération Internationale du Diabète (FID), les 5 pays ayant la plus forte prévalence de diabète sont la République de Nauru (située en Micronésie) (31%), les Emirats Arabes Unis (19%), l'Arabie Saoudite (17%), l'île Maurice (16%) et le Royaume de Bahreïn (situé au Moyen-Orient) (15%) (Figure 2).

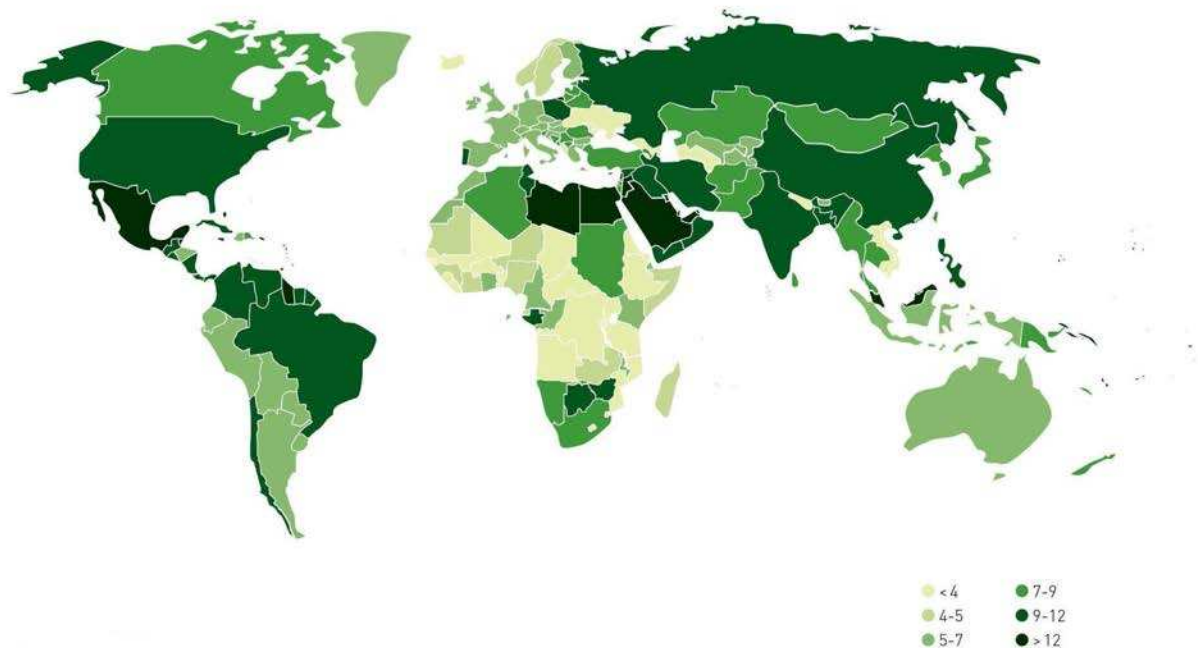


Figure 2 : Prévalence (en %) du diabète de type 2 chez des personnes âgées de 20 à 79 ans en 2011 (d'après l'OMS).

A ce jour, l'Europe compte 30 millions de personnes diabétiques soit 4% de la population mais ce chiffre atteindra les 50 millions en 2025, avec une prévalence particulièrement importante en Italie du Sud (rapport de l'ALFEDIAM (Association de Langue Française pour l'Etude du DIAbète et des maladies Métaboliques) Source : BEH (Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire) n°20-21 /2002).

Selon les données publiées dans le BEH de l'Institut national de Veille Sanitaire (InVS) de 2010, en France, 2,9 millions de personnes étaient traitées pour un diabète en 2009 soit 4,4% de la population française, alors que leur nombre était de 1,6 millions en 2000 [Ricci P *et al.* 2010]. Ce sont les régions du nord-est de la France, dont le Nord-Pas-de-Calais en tête, qui présentent une fréquence du diabète plus élevée que la moyenne nationale, soit au moins 5% (Figure 3). Il en est de même en outre-mer où les taux atteignent jusqu'à 8,8% à la Réunion et 8,1% en Guadeloupe. Les régions les moins touchées sont la Bretagne, les Pays de la Loire et l'Aquitaine (Figure 3). Le DT2 représente 90% de l'ensemble des formes de diabète et touche tous les âges, tous les sexes et toutes les catégories socio-professionnelles.

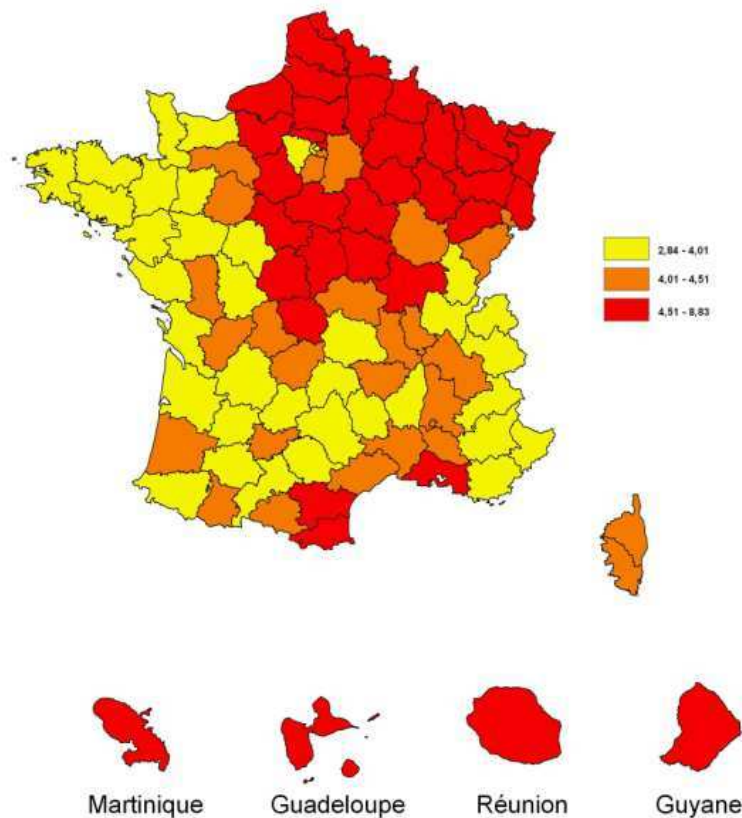


Figure 3 : Prévalence du diabète de type 2 en France en 2009 (d'après Ricci et al. 2009).

L'augmentation de la prévalence du DT2 peut s'expliquer par différents facteurs environnementaux dont l'espérance de vie qui ne cesse d'augmenter. Or, il est connu que le vieillissement est un facteur de risque du DT2, d'une part par la diminution de la sécrétion d'insuline et d'autre part par l'augmentation de la résistance à l'insuline. Par ailleurs, l'obésité ainsi que l'inactivité physique sont en nette augmentation, notamment dans les pays industrialisés ; à l'échelle mondiale, le nombre de cas d'obésité a doublé depuis 1980 (Source WHO (World Health Organization), Aide-mémoire N°311 mai 2012). Or, selon l'OMS, 79% de la fraction du DT2 est attribuable à l'obésité et au surpoids. Les différents facteurs environnementaux ayant un impact sur l'augmentation du risque de DT2 seront détaillés par la suite.

Au commencement, le DT2 étant le plus souvent asymptomatique, il est très difficile de déterminer la prévalence exacte de cette pathologie. En effet, elle est souvent diagnostiquée avec au minimum 5 années de retard ce qui fait que, en France, 500 000 à 800 000 individus diabétiques ignorent qu'ils sont atteints de cette maladie. Néanmoins, le diabète ne cesse de progresser et le nombre de patients

augmente d'année en année dans le monde entier y compris dans les pays en voie de développement.

Depuis 1998, le diabète est une priorité de santé publique en France, avec la publication du rapport du Haut Comité de la santé publique la même année et la déclaration en 2001 du plan national Diabète dans le cadre du PNNS (Programme National Nutrition Santé).

a. Prévalence selon le sexe

Les données de la prévalence du DT2 selon le sexe sont controversées et dépendent des critères à partir desquels les études se sont basées. En effet, l'étude réalisée par Pomerleau *et al.* montre que la prévalence du DT2, diagnostiquée sur la base de la glycémie à jeun (Critères de l'ADA), est plus importante chez les hommes que chez les femmes (6,4 versus 3,3%) [Pomerleau *et al.* 1999]. Contrairement à ces données, celles combinées chez les Européens [DECODE Study Group 2003], les Asiatiques [Qiao *et al.* 2000] et diverses populations de l'hémisphère sud [Shaw *et al.* 1999] montrent que la prévalence du DT2, basée sur des valeurs de glucose à 2h après un test HGPO (HyperGlycémie Provoquée par voie Orale (ingestion de 75 g de glucose)) (critères de l'OMS), est moins importante chez les hommes que chez les femmes (4,2 versus 4,7%). De plus, il a été mis en évidence qu'une régulation anormale du glucose était plus fréquente chez les femmes ayant une maladie des artères coronaires que chez les hommes, suggérant que le DT2 a un effet synergique plus fort sur le risque cardio-vasculaire chez les femmes que chez les hommes [Dotevall *et al.* 2007].

Selon les données publiées dans le bulletin épidémiologique hebdomadaire de l'InVS de 2010, en France, à âge égal, la prévalence du diabète est plus élevée chez les hommes (6,4%) que chez les femmes (4,5%), sauf dans les départements d'outre-mer (DOM) où la prévalence est moins élevée chez les hommes que chez les femmes (7,9 % chez les hommes versus 9,6 % chez les femmes à La Réunion, 7,0 versus 9,1% en Guadeloupe, 6,2 versus 8,2% en Martinique et 5,7 versus 8,6% en Guyane) (Figure 4).

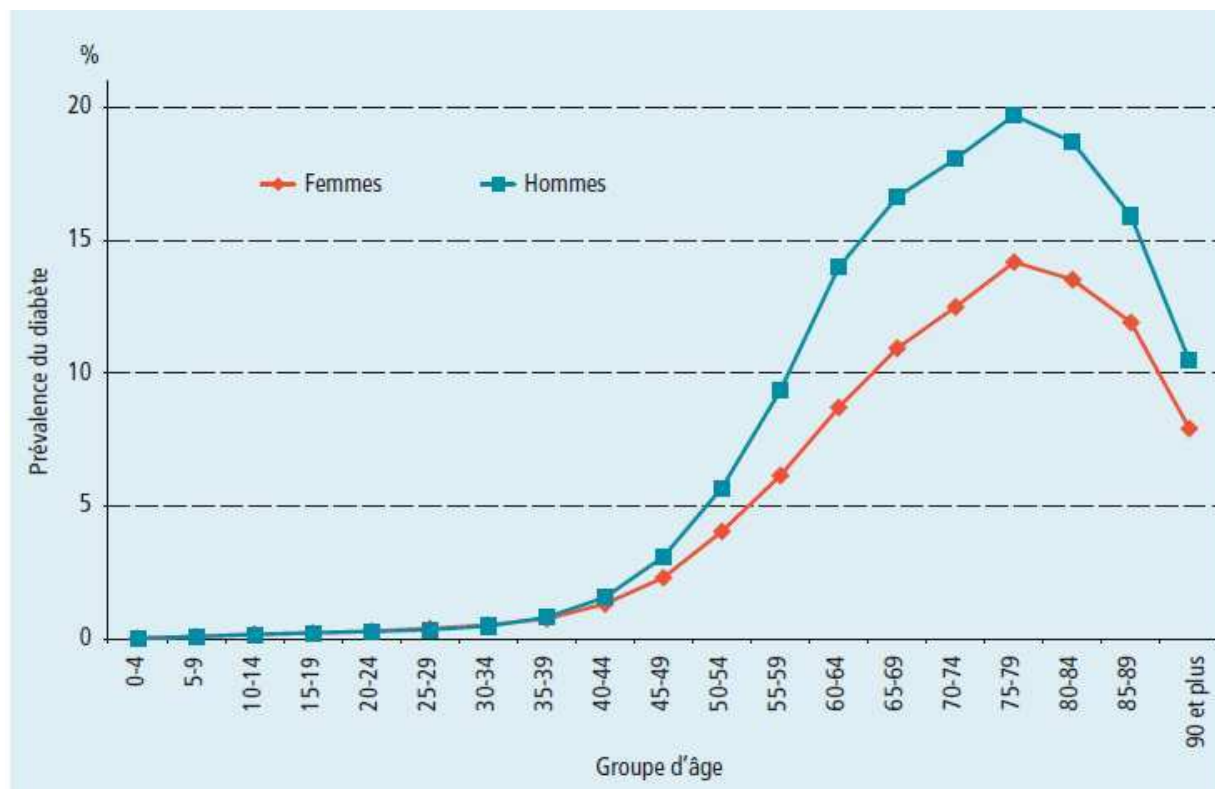


Figure 4 : Prévalence du diabète en fonction de l'âge et du sexe, en 2009 en France (d'après Ricci et al. 2009).

Il a été démontré que les femmes ont une glycémie à jeun plus basse que les hommes [Harris *et al.* 1987] et qu'elles présentent une diminution plus rapide de la glycémie durant des phases de jeûne prolongé comparées aux hommes [Fajans *et al.* 1976]. Il a également été suggéré que la différence de prévalence du DT2 entre les deux sexes peut être liée aux différences dans le degré de l'activité physique entre les hommes et les femmes ou à un effet des estrogènes sur l'homéostasie glucidique (utilisation de contraceptifs oraux et phases du cycle menstruel). Des données allant dans le même sens montrent que les femmes sont relativement protégées contre l'insulino-résistance induite par les acides gras (AG) [Blaak 2008]. Les stratégies de prévention et de gestion du DT2 doivent donc tenir compte du sexe des individus car ce dernier semble avoir un rôle important sur le métabolisme glucidique.

b. Prévalence selon l'âge

Selon les chiffres de l'InVS, le taux de croissance annuel moyen du nombre de sujets diabétiques concerne toutes les classes d'âge. Cependant, l'étude réalisée en

2010 par Ricci *et al* sur la prévalence du diabète en France montre qu'il existe une différence importante en fonction de l'âge : 0-44 ans (0,4%), 45-64 (6,3%), 65-74 ans (14,2%) et 75 ans et plus (14,8%) (Figure 4) [Ricci P *et al.* 2010].

D'après ces données, nous pouvons constater que les personnes âgées de 45 à 70 ans sont les plus touchées par le diabète. Cependant, du fait de la progression plus ou moins lente de la maladie et de son diagnostic retardé, il est normal de retrouver plus de cas de DT2 chez les personnes âgées.

Le DT2 touche donc essentiellement les personnes âgées de plus de 45 ans mais il est en nette progression chez les sujets âgés entre 30 et 45 ans ainsi que chez les enfants [D'Adamo *et al.* 2011].

c. Cas des enfants et des adolescents

Durant ces dernières décennies, le DT2 était considéré comme une maladie métabolique ne touchant que les adultes. Cependant, le nombre d'enfants diabétiques a considérablement augmenté, en particuliers dans les pays en voie de développement (Figure 5).

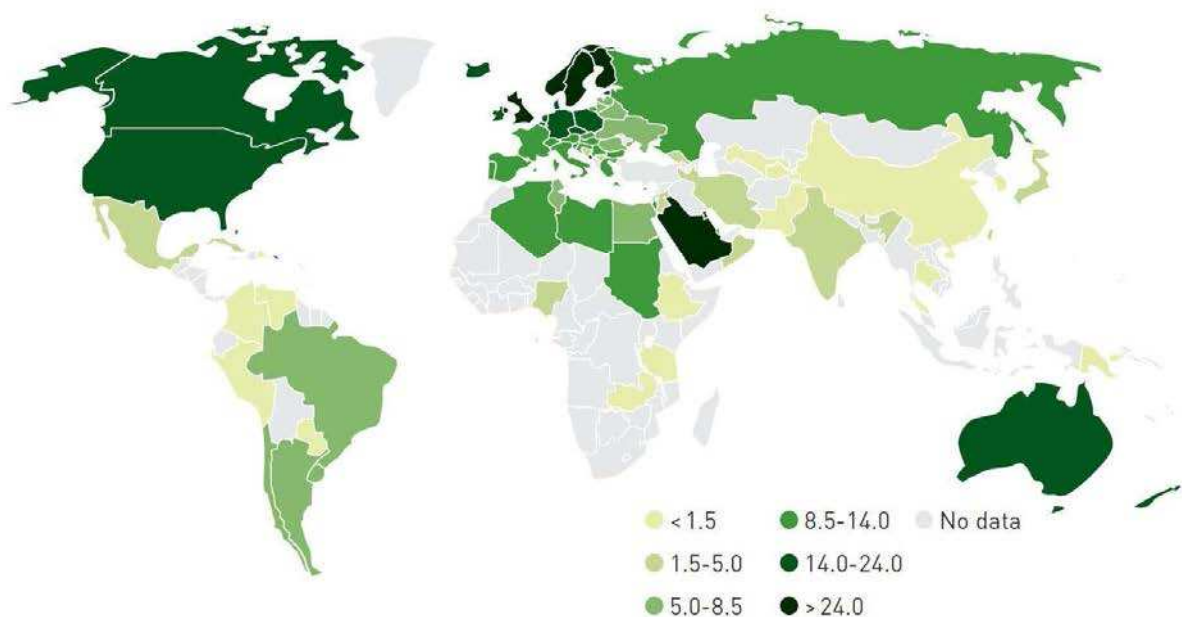


Figure 5 : Nouveaux cas de diabète pour 100 000 enfants âgés de 0 à 14 ans, en 2011 (d'après l'OMS).

En accord avec la progression épidémique mondiale de l'obésité infantile, l'IG ainsi que le DT2 deviennent de plus en plus communs chez les enfants et les adolescents obèses [D'Adamo *et al.* 2011]. Alors qu'il y a 10 ans, le DT2 représentait moins de 3% de tous les nouveaux de diabète chez les adolescents, il représente aujourd'hui, près de 45% des cas [Pinhas-Hamiel *et al.* 2005] [Pinhas-Hamiel *et al.* 2007]. Chez les enfants obèses, la progression de la résistance à l'insuline jusqu'au DT2 est plus rapide que chez les adultes. De plus, leur DT2 est souvent associé à des complications métaboliques et cardiovasculaires sévères [D'Adamo *et al.* 2011].

L'étude SEARCH est une étude américaine réalisée en 2007 qui a pour but d'estimer l'incidence du diabète chez les enfants et les adolescents de moins de 20 ans selon l'ethnie et le type de diabète [Dabelea *et al.* 2007]. Dans cette étude, les chercheurs ont mis en évidence une variation de l'incidence du DT2 en fonction de l'ethnie, avec un taux plus important pour les enfants et les adolescents âgés entre 15 et 19 ans issus des populations minoritaires. En effet, l'étude a montré que les taux de DT2 (pour 100 000 personnes/an) étaient plus importants parmi les jeunes amérindiens (25,3 pour les 10-14 ans et 49,4 pour les 15-19 ans), suivi par les jeunes afro-américains (22,3 et 19,4, respectivement), les jeunes venant des îles d'Asie et du Pacifique (11,8 et 22,7, respectivement) et les jeunes hispaniques (8,9 et 17,0, respectivement) et ces taux étaient plus bas parmi les jeunes blancs non-hispaniques (3,0 et 5,6, respectivement) [Dabelea *et al.* 2007].

Cependant, le DT2 chez les jeunes n'est pas qu'un phénomène américain ; de plus en plus de cas sont reportés à travers le monde. Par exemple, 80% des nouveaux cas de diabète répertoriés chez les jeunes au Japon sont des DT2. Cependant, des études européennes montrent que le DT2 chez les enfants n'est pas aussi commun qu'aux Etats-Unis ; il représente seulement 1 à 2% des cas de diabète. Néanmoins, il ne faut pas négliger le DT2 chez les enfants et les adolescents en Europe car le taux d'obésité dans cette population est en nette progression depuis quelques années.

L'identification des enfants et des adolescents obèses ayant un risque de développer un DT2 est essentielle si l'on veut pouvoir interrompre sa progression et empêcher les complications cardiovasculaires associées au DT2 dans cette population.

d. Prévalence selon les ethnies

Il est reconnu que l'ethnicité influence le risque et la nature du diabète. La plupart des études réalisées sur le rôle de l'ethnicité dans le DT2 ont été réalisées au Royaume-Uni car il existe une importante population multi-ethnique dans ce pays [UK Prospective Diabetes Study 1994] [1998] [Davis 2008] [Retnakaran *et al.* 2006]. Ces études ont montré que le risque d'obésité et de DT2 est 6 fois plus important chez les personnes originaires d'Asie du sud (Indiens, Pakistanais et Bangladais) et jusqu'à 3 fois plus important chez les personnes d'origine afro-antillaise comparées aux personnes blanches d'origine européenne (Caucasiens). Dans ces études, les sujets Asiatiques étaient moins obèses (IMC (Indice de Masse Corporelle) de 26,7 versus 29,3 kg/m² pour les Caucasiens et 27,9 kg/m² pour les Afro-antillais), avaient un meilleur ratio tour de taille/tour de hanches (RTH) et une plus faible prévalence d'avoir un parent de premier degré avec un diabète (34 versus 36% pour les Caucasiens et 44% pour les Afro-Antillais). Cependant, ils avaient une activité physique moins importante et présentaient un DT2 plus précoce (2% présentaient un DT2 entre 16 et 34 ans) [UK Prospective Diabetes Study 1994]. Les sujets Afro-Antillais avaient une glycémie à jeun plus élevée (12,5 versus 11,9 mmol/L pour les Caucasiens et 11,3 mmol/L pour les Asiatiques), une dysfonction de la cellule bêta plus importante (HOMA-B (HOMeostasie Model Assesment- β -cell function) + 28%) et une résistance à l'insuline plus importante (HOMA-IR (HOMeostasie Model Assesment-Insulin Resistance) + 27%) [UK Prospective Diabetes Study 1994]. De plus, une étude réalisée par Chan *et al.*, en 2009, montre que l'augmentation de l'incidence du DT2 est plus importante dans les pays asiatiques que dans les pays européens. Les personnes d'origine asiatique semblent donc être plus susceptibles à la résistance à l'insuline et au DT2 que les populations d'origine européenne [Chan *et al.* 2009].

En France, selon les données publiées dans le bulletin épidémiologique hebdomadaire de l'InVS de 2010, il a été mis en évidence que la prévalence du diabète dépend également de l'origine ethnique. En effet, les femmes d'origine maghrébine ont un risque de diabète plus de 2 fois supérieur à celui des femmes d'origine française.

2. Morbidité et mortalité associées au diabète de type 2

Le DT2 est responsable d'environ 5% de la mortalité dans le monde chaque année et représente la 4^{ème} ou 5^{ème} cause de mortalité dans la plupart des pays développés. En 2005, plus d'1,1 million de personnes sont décédées dans le monde des conséquences d'un DT2 dont 80% dans des pays à revenu faible ou intermédiaire (données de l'OMS).

En France, une étude de l'InVS de 2009 a montré que le taux de mortalité des personnes traitées pour un diabète était de 29,5/1 000 personnes avec un âge moyen de 74,6 ans pour les hommes et de 79,6 ans pour les femmes [Ricci P *et al.* 2010]. De plus, 50% des décès provoqués par le diabète surviennent chez des personnes âgées de moins de 70 ans [Ricci P *et al.* 2010].

Les causes de la mortalité des personnes diabétiques sont les complications microvasculaires et macrovasculaires : elles sont responsables d'1 million de morts dans le monde. Il a été mis en évidence que le risque de mourir d'une maladie cardiovasculaire avant l'âge de 40 ans est 20 fois plus élevé chez les personnes ayant un DT2.

L'étude de l'InVS a également montré que la mortalité des personnes diabétiques était en baisse de 10% entre la période 2001-2006 et 2009 avec, cependant, un taux 1,5 fois plus élevé chez les hommes que chez les femmes [Ricci P *et al.* 2010]. Cette baisse du taux de mortalité peut s'expliquer par l'amélioration des traitements des facteurs de risque cardiovasculaire (antihypertenseurs, statines et antiagrégants plaquettaires), avec des résultats tangibles sur le contrôle de la pression artérielle et des niveaux lipidiques [Fagot-Campagna *et al.* 2009]. Ainsi, la fréquence du traitement par statine a doublé en 9 ans, or, ils ont fait la preuve de leur impact sur la morbi-mortalité cardiovasculaire et globale chez les diabétiques [Kearney *et al.* 2008].

Les prévisions de l'OMS ne sont pas très rassurantes car elle prévoit une augmentation du risque de décès dus au diabète de plus de 50% au cours des 10 prochaines années pour atteindre plus de 439 millions de personnes dans le monde en 2030 [Chamnan *et al.* 2011]. Cette maladie représente donc un problème majeur de santé publique non seulement en France mais également dans le monde.

III. Diagnostic clinique du diabète de type 2

1. Symptômes et diagnostic du diabète de type 2

Les patients diabétiques peuvent présenter plusieurs symptômes tels qu'une polydipsie (le sujet boit beaucoup d'eau), une polyurie (le sujet urine beaucoup), une polyphagie (le sujet mange beaucoup), un amaigrissement ainsi qu'une grande fatigue. Cependant l'apparition de ces symptômes ne se fait que tardivement. En l'absence de symptômes cliniques, le diagnostic de diabète peut se faire par une mesure de la glycémie.

La Haute Autorité de Santé (HAS) et l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) ont approuvé les critères diagnostiques du diabète revus par l'OMS en 1999 [Alberti *et al.* 1999] indiquant que le diagnostic peut être établi de 3 façons différentes : (i) par une glycémie veineuse à jeun $> 1,26$ g/L (7,1 mmol/l) et vérifiée à 2 reprises, (ii) par la présence de symptômes de diabète (polyurie, polydipsie, amaigrissement) associés à une glycémie ≥ 2 g/L (11,1 mmol/L) ou (iii) par une glycémie ≥ 2 g/L (11,1 mmol/L) 2 h après un test HGPO [Genuth *et al.* 2003]). Ces critères diagnostiques du diabète ont été émis à la suite d'études observationnelles qui ont déterminé les valeurs de glycémies auxquelles correspondent l'apparition des complications microvasculaires du DT2.

Il existe deux types d'anomalies de la régulation de la glycémie constituant des situations à risque de développer un diabète : une IG, caractérisée par une glycémie à jeun $< 1,26$ g/L (7,1 mmol/l) et comprise dans l'intervalle [1,40 g/L-1,99 g/L] 2 h après un HGPO ou une hyperglycémie modérée à jeun caractérisée par une glycémie comprise dans l'intervalle [1,10 g/L-1,26 g/L] et $< 1,40$ g/L 2 h après un HGPO.

En janvier 2010, de nouvelles recommandations ont été publiées par l'ADA. Selon cette organisation, le diagnostic du DT2 est établi quand un patient présente des symptômes classiques d'hyperglycémie (polydipsie, polyurie, perte de poids, vision trouble) et a des valeurs moyennes de glucose sanguin ≥ 2 g/L. Plus récemment, lors de la réunion annuelle de l'ADA en janvier 2012, la question de l'utilisation de l'hémoglobine glyquée (HbA1c) comme critère diagnostique du diabète a été soulevée [American Diabetes Association 2012]. En effet, un groupe de travail a présenté des propositions visant à permettre le diagnostic du diabète à partir d'1 ou 2 valeurs d'HbA1c. Cela pourrait simplifier le travail de dépistage puisque le recours

à des tests de tolérance au glucose implique beaucoup plus de temps et d'argent que la mesure de l'HbA1c.

2. Facteurs de risque du diabète de type 2

Le DT2 est une maladie multifactorielle qui fait intervenir à la fois des facteurs génétiques et à la fois des facteurs environnementaux. Il est important de bien connaître ces facteurs pour mieux comprendre l'apparition de la maladie.

a. Facteurs environnementaux

L'influence des facteurs environnementaux dans le DT2 a été mise en évidence par les études de migrants, en comparant la fréquence du DT2 entre sujets de même origine ethnique, restés dans leur zone géographique d'origine ou ayant migrés. L'obésité est reconnue depuis longtemps comme un facteur de risque important de DT2 : 40 à 60% des individus obèses sont atteints d'un DT2. En effet, les patients obèses, c'est-à-dire ayant un IMC > 30 kg/m², ont un risque 10 fois plus élevé de devenir diabétiques que les individus non obèses. Des études prospectives suédoises ont montré que la distribution abdominale de la graisse, reflétée par l'augmentation du RTH était prédictive du risque de DT2 [Ohlson *et al.* 1985]. Ces associations entre répartition abdominale de la graisse et le DT2 ainsi que les maladies cardiovasculaires semblent s'expliquer par l'afflux des acides gras libres (AGL) déversés par la graisse intra-abdominale dans le sang puis le foie, avec de nombreuses conséquences métaboliques telles que l'hyperinsulinémie, l'insulino-résistance, l'augmentation des VLDL (Very Low-Density Lipoproteins), des triglycérides (TG) et la baisse du HDL-cholestérol (High-Density Lipoprotein-cholestérol).

De plus, il est reconnu que le fait d'avoir un syndrome métabolique multiplie par 5 le risque de développer un DT2 [Ford *et al.* 2008]. Dans l'étude française DESIR (n=3774), le syndrome métabolique est associé à une augmentation du risque de DT2 chez les hommes (Odds Ratio (OR)=2,4) et chez les femmes (OR=3,4) [Hillier *et al.* 2006]. Le syndrome métabolique se définit par 3 des 5 critères suivants : (i) avoir un tour de taille \geq 94 cm pour les hommes et \geq 80 cm pour les femmes d'origine européenne, (ii) une hypertriglycémie > 1,5 g/L (1,7 mmol/L) ou traitement hypolipémiant, (iii) un HDL-cholestérol < 0,40 g/L (1,03 mmol/L) pour les hommes et

< 0,50 g/L (1,29 mmol/L) pour les femmes ou traitement hypolipémiant, (iv) une hypertension artérielle (HTA) (pression artérielle systolique \geq 130 mmHg et/ou pression artérielle diastolique \geq 80 mmHg) ou traitement anti-hypertenseur ou (v) une glycémie à jeun \geq 1 g/L ou traitement anti-diabétique (définition proposée par la FID en 2009, en partenariat avec l'AHA (American Heart Association), le NHLBI (National Heart Lung and Blood Institute), la société internationale d'athérosclérose et l'association internationale pour l'étude de l'obésité) [Alberti *et al.* 2009].

Le risque de développer un DT2 diffère entre les hommes et les femmes. En effet, les perturbations métaboliques sont plus fréquentes chez l'homme, que chez la femme. Chez les femmes, l'excès de graisse se localise surtout au niveau de la poitrine, du bas ventre, des hanches, des fesses et des cuisses ; on parle de répartition de la graisse de type gynoïde. Chez l'homme, elle se situe plutôt sur le haut du ventre, le thorax, les épaules et les bras ; on parle de répartition de type androïde. De plus, l'homme possède au moins 2 fois plus de graisse intra-abdominale que la femme ; or, la graisse viscérale est plus néfaste pour la santé. Elle entraîne souvent des complications métaboliques (diabète, hypercholestérolémie, hypertriglycéridémie) et des complications cardio-vasculaires (HTA, angine de poitrine, infarctus, insuffisance cardiaque, accidents vasculaires). La différence sexuelle de la répartition de la graisse incite à penser que les hormones sexuelles pourraient avoir un rôle dans l'origine de ces phénomènes. En effet, après la ménopause (période de modifications hormonales importantes), les femmes présentent souvent une répartition androïde de leur graisse. Il a également été observé que les femmes présentant une hyperandrogénie (excès d'hormones sexuelles mâles) ont un taux élevé de facteurs de risque vasculaire, en particulier l'hyperinsulinémie. Des études indiquent que les androgènes inhibent la capacité des adipocytes à stocker les lipides [Mauras *et al.* 1998]. Les androgènes sont d'importants régulateurs de la masse grasseuse et de sa distribution chez les mammifères [Singh *et al.* 2006]. Des études ont montré que des suppléments en testostérone diminuent la masse grasse chez les hommes présentant un hypogonadisme avec des concentrations en testostérone faibles [Bhasin *et al.* 2001].

Le manque d'activité physique et l'alimentation (hypercalorique et/ou hyperlipidique) constituent aussi des facteurs de risque de DT2 particulièrement importants. De nos jours, ces facteurs délétères sont présents dans tous les pays du monde ; des modifications des habitudes alimentaires ont été introduites de par la

facilité d'accès à la nourriture entraînant une augmentation des apports caloriques, un accroissement de la consommation de graisses ainsi qu'une réduction de la consommation de fibres. En revanche, l'augmentation de la consommation de sucre et de sucreries ne paraît pas constituer en soi un facteur de risque de DT2. La consommation d'alcool peut engendrer une pancréatite, une atteinte hépatocellulaire, voire une cirrhose du foie, favorisant ainsi l'apparition d'un DT2. Par ailleurs, une relation inverse entre l'intensité de l'activité physique et le risque de développer ultérieurement un DT2 a été mise en évidence par plusieurs études épidémiologiques. L'activité physique, en mobilisant la graisse intra-hépatique et intra-musculaire, diminue l'insulino-résistance.

La conjonction de ces modifications nutritionnelles et des changements d'activité physique a été particulièrement amplifiée au niveau des populations qui ont migré depuis les zones rurales vers les grandes villes. En effet, il existe une prévalence du DT2 beaucoup plus forte à la ville qu'à la campagne car les personnes vivant en ville sont généralement plus sédentaires [Ricci *et al.* 2010].

L'état nutritionnel pendant la vie fœtale et les premiers mois de la vie semble également jouer un rôle important dans le risque de DT2 à l'âge adulte [Kaijser *et al.* 2009]. Il est connu qu'avoir accouché d'un nouveau-né de gros poids (> 4 kg) augmente le risque de diabète chez la mère et augmente également le risque ultérieur pour cet enfant devenu adulte, d'avoir un DT2. Il a également été montré qu'avoir une hypotrophie néo-natale (avoir un faible poids de naissance) augmente la probabilité à l'âge adulte d'être atteint de DT2. L'hypothèse émise par Barker *et al.* est que la malnutrition fœtale induit des changements adaptatifs dans le métabolisme glucidique fœtal qui deviennent durables, ce qui contribue à augmenter le risque de DT2 et de maladies cardio-vasculaires à l'âge adulte [Barker *et al.* 2002].

Les antécédents de diabète familial (du premier degré), de diabète temporaire, de diabète gestationnel sont également des facteurs qui peuvent augmenter le risque de développer un DT2.

b. Facteurs génétiques

En 1984, le marathonien James Fixx mourrait à l'âge de 52 ans d'un infarctus du myocarde, alors qu'il s'entraînait à son sport favori qu'il avait tant promu comme moyen de prévention de l'obésité et des maladies cardiovasculaires. Lui-même avait arrêté de fumer à 35 ans et perdu près de 25 kilos. En 1965, Winston Churchill mourrait à l'âge de 91 ans. Pourtant, il fumait le cigare sans modération, aimait la bonne chère, le whisky et pesait plus de 120 kg. Or, si l'on considère les données épidémiologiques des risques liés à l'obésité et au tabagisme, Churchill aurait dû mourir à 50 ans et James Fixx à 90 ans. Cette contradiction peut s'expliquer par l'influence des gènes responsables de la mise en place d'un terrain favorable à la prise de poids, par exemple.

Des études ont montré que l'héritabilité du DT2 est élevée. En effet, le taux de concordance du DT2 est très élevé chez les jumeaux monozygotes (si l'un développe la maladie, l'autre a 100% de risque d'en être aussi atteint). De même, le risque de diabète est élevé chez les descendants de parents atteints par la maladie (50% des malades ont des antécédents familiaux de diabète). Enfin, avoir une origine non caucasienne et/ou migrante augmente le risque de DT2 [Rathmann *et al.* 2011].

De nombreuses études ont permis d'identifier des gènes de susceptibilité au DT2, c'est-à-dire des gènes pouvant augmenter le risque de développer un DT2. La part de la contribution génétique dans le développement du DT2 sera développée dans le chapitre VI.

IV. Régulation de la glycémie

Tous les organes ont besoin de sucre pour pouvoir fonctionner. Le glucose est la principale source énergétique métabolique de l'organisme ; il doit donc être finement régulé pour demeurer à une concentration sanguine d'environ 1 g/L soit environ 5 mmol/L.

1. Organes impliqués dans la régulation de la glycémie

a. Le pancréas

i. Sa composition

Le pancréas est une glande mixte c'est-à-dire à la fois exocrine et endocrine, d'environ 12 cm de longueur (Figure 6), qui est à l'origine de la sécrétion d'insuline, la principale hormone hypoglycémiante.

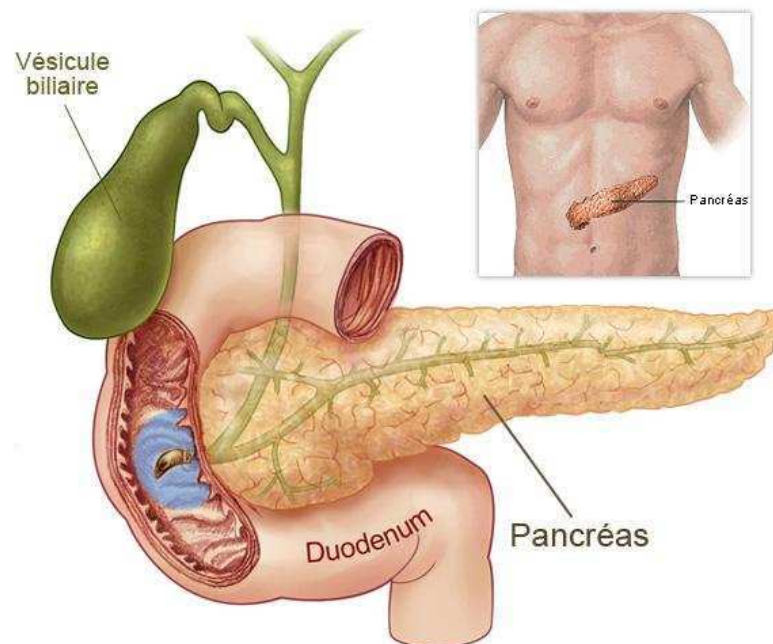


Figure 6 : Anatomie du pancréas.

Le pancréas est formé de 2 groupes de cellules glandulaires :

- Des cellules regroupées en amas pour former les acini ; ces derniers représentent 99% des cellules épithéliales glandulaires du pancréas et forment la partie exocrine. Les acini sécrètent le suc pancréatique liquide contenant des enzymes digestives. Les sécrétions pancréatiques exocrines sont transmises des cellules sécrétrices du pancréas à des petits canaux qui convergent pour former les deux canaux qui amènent les sécrétions vers l'intestin grêle. Le plus petit rejoint directement l'intestin grêle, le plus gros, appelé le canal pancréatique, s'unit au canal cholédoque en provenance du foie et de la vésicule biliaire pour former l'ampoule hépatopancréatique dont le contenu se déverse dans l'intestin grêle. Le suc pancréatique est constitué de plusieurs enzymes dont : l'amylase pancréatique (hydrolyse de

glucides), la trypsine, la chymotrypsine, la carboxypeptidase (hydrolyse des protéines et des polypeptides), la lipase pancréatique (hydrolyse des TG), la ribonucléase et la désoxyribonucléase (hydrolyse des acides nucléiques).

- Des cellules regroupées en amas appelés "îlots de Langerhans" ; ils représentent 1% des cellules épithéliales glandulaires du pancréas (Figure 7). Les cellules de ces îlots constituent la partie endocrine du pancréas. Elles synthétisent et sécrètent différentes hormones.

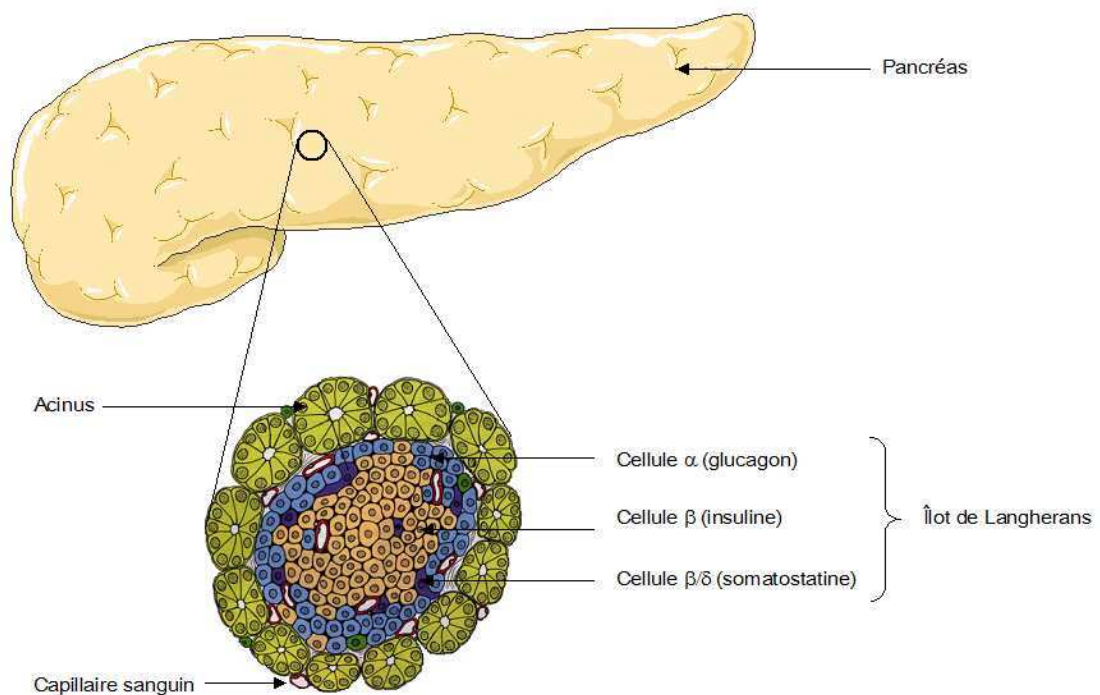


Figure 7 : Schéma d'un îlot de Langerhans et d'acini provenant du pancréas.

Les îlots de Langerhans sont constitués de cellules bêta sécrétant l'insuline (représentant 65-90% de l'îlot) et forment le noyau de l'îlot, de cellules alpha sécrétant le glucagon (représentant 15 à 20% de l'îlot), de cellules delta sécrétant la somatostatine (représentant 3 à 10% de l'îlot) et de cellules produisant le polypeptide pancréatique (représentant 1% de l'îlot) souvent situées à la surface de l'îlot [Elayat *et al.* 1995] (Figure 7).

ii. La cellule β -pancréatique

Après la 4^{ème} semaine du développement embryonnaire, des grappes isolées de cellules épithéliales bourgeonnent des tubules digestifs et s'accumulent dans le mésoderme pour former les cellules des îlots [Dudek 2007]. Ces dernières sécrètent de l'insuline après la 10^{ème} semaine. Le renouvellement des cellules β -pancréatiques adultes est un processus lent, seules 1% des cellules entrent en mitose à partir de la phase G0 [Berne 1998]. Les nouvelles cellules bêta prennent leur origine des précurseurs exprimant PDX1. Chez l'homme, PDX1 (Pancreatic Duodenal homeobox 1) est le facteur de transcription le plus important impliqué dans la différenciation spécifique des cellules β -pancréatiques et dans l'induction de la sécrétion d'insuline [Stoffers *et al.* 1997] [Brissova *et al.* 2002] [Johnson *et al.* 2003]. Différents facteurs de croissance, incluant l'EGF (Epidermal Growth Factor), le TGF- α (Transforming Growth Factor- α), l'hormone de croissance et l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) sont impliqués dans le renouvellement des cellules bêta et leur croissance. Le glucose est également capable de stimuler la croissance des cellules bêta ainsi que leur destruction. Il maintient la quantité adéquate de ces cellules, processus important pour la régulation du métabolisme glucidique.

b. Les autres organes impliqués dans la régulation de la glycémie

D'autres organes jouent des rôles plus ou moins importants dans la régulation de la glycémie tels que le foie, le tissu adipeux, les muscles et les reins.

Le foie exerce un effet tampon indispensable pour parer aux variations de la glycémie lors d'un apport alimentaire par le biais de 3 mécanismes : (i) la glycogénèse ou synthèse de glycogène qui permet de mettre en réserve le glucose sous forme de glycogène grâce à la glycogène synthétase, (ii) la glycogénolyse ou dégradation du glycogène qui se produit grâce à une glycogène phosphorylase : on obtient ainsi du glucose-1-phosphate (P) qui sera converti en glucose-6-P. Ce dernier ne peut traverser la membrane cellulaire des hépatocytes, mais le foie contient une enzyme, la glucose-6 phosphatase qui va le déphosphoryler et permettre au glucose de passer dans la circulation, (iii) la néoglucogénèse, c'est-à-dire la synthèse de glucose à partir de composés non glucidiques, afin de protéger l'organisme et surtout le système nerveux central contre les effets de l'hypoglycémie. Ces composés non glucidiques sont : le glycérol provenant de la dégradation des TG

(lipolyse), les acides aminés (AA) glucoformateurs par dégradation de protéines (alanine, valine....) et l'acide lactique provenant des muscles. Ainsi lorsque la glycémie augmente, le foie va s'orienter vers une glycogénèse et lorsqu'elle diminue, il va s'orienter vers une néoglucogénèse. Cependant cette régulation hépatique est lente et imprécise et donc insuffisante pour corriger les variations brutales de glycémie d'où la nécessité d'avoir d'autres facteurs régulateurs.

Le tissu adipeux est le 2^{ème} réservoir de stockage glucidique de l'organisme. Lorsque la glycémie augmente, la lipogénèse permet la transformation des AG en TG, et la synthèse des AG à partir des glucides.

Les muscles, et plus particulièrement les cellules musculaires, sont également capables de mettre en réserve le glucose sous forme de glycogène. Cependant, la dégradation du glycogène dans les muscles n'aboutit pas directement au glucose mais à l'acide lactique car ceux-ci sont dépourvus de glucose-6-phosphatase.

Enfin, le rein et l'intestin participent également à l'homéostasie glucidique.

2. Régulation nerveuse de la glycémie

Le système nerveux participe également à la régulation de la sécrétion d'insuline. En effet, les îlots de Langerhans sont richement innervés, à la fois par des fibres sympathiques et par des fibres parasympathiques.

Les terminaisons nerveuses sympathiques libèrent la noradrénaline (le neuromédiateur le plus important de ce système) qui joue un rôle crucial lors d'une baisse soudaine de la glycémie. En effet, une diminution de glucose stimule les récepteurs hormonaux et par l'intermédiaire d'un mécanisme réflexe agit sur la glande médullosurrénale.

Les terminaisons nerveuses parasympathiques libèrent l'acétylcholine (neuromédiateur principal des terminaisons nerveuses pancréatiques) ainsi que du VIP (Vasoactive Intestinal Peptide), du PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide) et du GRP (Gastrin Releasing Peptide). Ces 4 hormones principales amplifient la sécrétion d'insuline induite par le glucose (leurs actions seront détaillées par la suite). Le système nerveux parasympathique participe à la coordination des réponses hyper et hypoglycémiques en intervenant à la fois sur l'insulino-sécrétion et à moindre degré sur la stimulation de sécrétion de glucagon [Ahren 2000] [Arimura *et al.* 1995].

3. Hormones hyperglycémiantes

Il existe plusieurs hormones hyperglycémiantes tels que :

Le glucagon, qui est produit par les cellules alpha des îlots de Langerhans du pancréas dont les effets s'opposent à ceux de l'insuline. En effet, la sécrétion de glucagon a pour rôle principal la mobilisation des substrats énergétiques stockés dans le foie et dans le tissu adipeux. Cette hormone, comme l'insuline, agit au niveau glucidique, lipidique et protéique. Au niveau glucidique, le glucagon (i) augmente la glycogénolyse hépatique (activation de la phosphorylase), (ii) diminue la glycogénèse (inactivation de la glycogène synthase), (iii) inhibe la glycolyse (inhibition de la 1-phosphofructokinase) et (iv) stimule la néoglucogénèse par activation de la fructose 1, 6 diphosphatase. Au niveau protéique, le glucagon accroît la capture des AA par les hépatocytes et favorise ainsi la néoglucogénèse à partir des AA [Quesada *et al.* 2008].

L'adrénaline, dont la sécrétion est essentiellement nerveuse, a pour cible les cellules hépatiques et musculaires. Elle inhibe la sécrétion d'insuline, augmente la sécrétion de glucagon, stimule la néoglucogénèse et entraîne une lipolyse majeure au niveau du tissu adipeux [Peterhoff *et al.* 2003].

Les glucocorticoïdes (cortisol) agissent au niveau du foie en stimulant la néoglucogénèse et au niveau des tissus périphériques en diminuant la consommation du glucose et en augmentant le catabolisme protéiques fournissant au foie des AA [De Martino *et al.* 2004].

D'autres hormones peuvent jouer un rôle plus ou moins important dans la régulation de la glycémie. Par exemple, l'hormone de croissance ou GH (Growth Hormone) stimule la néoglucogénèse et la sécrétion du glucagon et entraîne la lipolyse [Sekine *et al.* 1998]. Les hormones thyroïdiennes ont une action hyperglycémiantes et stimulent la glycogénolyse mais surtout l'absorption intestinale du glucose. L'acétylcholine est également une hormone hyperglycémiantes par stimulation de sécrétion de cortisol mais également par stimulation de lipolyse périphérique et de néoglucogénèse [Chan *et al.* 1997].

4. L'insuline : la seule hormone hypoglycémiante

a. Description de l'insuline

L'insuline vient du latin *insula* « île » car elle est uniquement synthétisée et sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. C'est une hormone polypeptidique de poids moléculaire d'environ 6 kDa composée de 2 chaînes A et B reliées par 2 ponts disulfure (Figure 8).

Le gène de l'insuline est composé de 4 exons et de 2 introns et est remarquablement bien conservé au cours de l'évolution. Il se situe sur le chromosome 11, chez l'homme, et contrôle la synthèse du précurseur de l'hormone (la préproinsuline). Ce dernier possède un signal peptidique qui dirige la chaîne peptidique dans le réticulum endoplasmique et contient 4 peptides : le peptide signal N-terminal, la chaîne B, le peptide C et la chaîne A (Figure 8). Une fois dans le réticulum endoplasmique, la préproinsuline va subir le clivage de son peptide signal et la formation de ponts disulfure entre les chaînes A et B, formant ainsi la proinsuline. Cette dernière passe ensuite dans l'appareil de Golgi où elle sera dirigée dans des vésicules. Une fois dans ces vésicules, la proinsuline va subir le clivage de son peptide C, formant ainsi l'insuline mature stockée sous forme d'hexamères contenant du zinc jusqu'à ce qu'elle soit sécrétée (Figure 8) [Koolman *et al.* 2005].

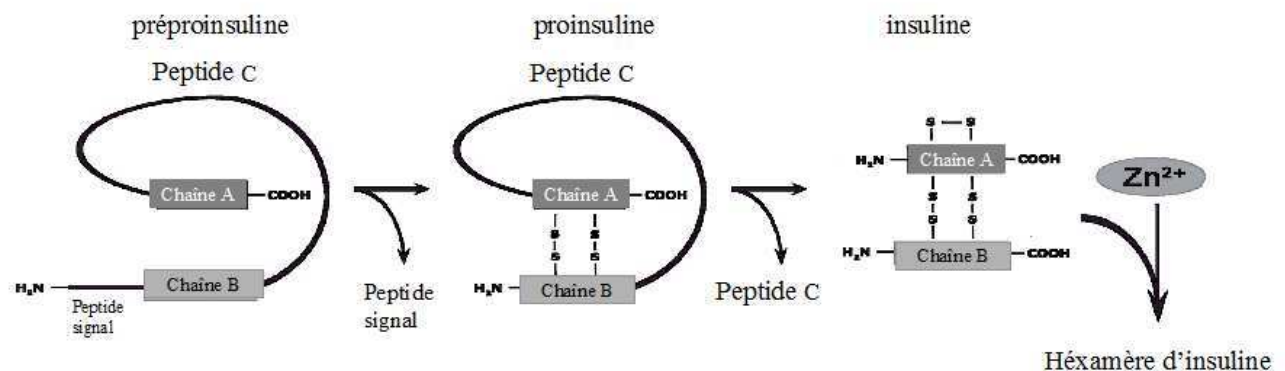


Figure 8 : Biosynthèse de l'insuline (d'après Skelin *et al.* 2010).

Pendant longtemps, les chercheurs pensaient que le peptide C jouait un rôle dans la synthèse de l'insuline mais qu'une fois clivé, il devenait inactif [Wahren *et al.* 2000]. Récemment, des études ont mis en évidence que le peptide C possède une

activité biologique importante, notamment au niveau de la prévention et de l'amélioration des neuropathies et des néphropathies diabétiques chez les personnes diabétiques de type 1 [Hills *et al.* 2009]. Concernant le DT2, les données sont plus controversées et nécessitent des études plus approfondies. En effet, une étude réalisée par Marx *et al.* montre la co-localisation de dépôts de peptide C avec des lymphocytes CD4⁺ dans des lésions athérosclérotiques chez les personnes diabétiques de type 2 contrairement aux personnes non diabétiques [Marx *et al.* 2004]. Ces données suggèrent un rôle probable du peptide C dans le développement de l'inflammation vasculaire et de l'athérosclérose dans le DT2. Cependant, Luppi *et al.* ont démontré que le peptide C induisait une réduction de l'expression de plusieurs marqueurs biochimiques de la dysfonction endothéliales dans des cellules endothéliales aortiques humaines (HAECs pour Human Aortic Endothelial Cells), suggérant que le peptide C jouerait un rôle anti-inflammatoire et potentiellement anti-athérogénique [Luppi *et al.* 2008].

Les mesures de peptides C ont également été utilisées pour classifier les différents diabètes mais aussi comme marqueur de la fonction de la cellule β -pancréatique. En effet, la sécrétion de peptide C dans le système sanguin se fait à une concentration équimolaire de celle de l'insuline, ce qui en fait un marqueur de la sécrétion d'insuline important car, comme l'insuline, le peptide C est modulé par le métabolisme hépatique [Hills *et al.* 2009].

Plusieurs voies de signalisation sont fortement activées et de façon dose-dépendante par le peptide C, dans différents types cellulaires, [Hills *et al.* 2009]. En effet, le peptide C se fixe sur des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), entraînant l'activation de voies de signalisation dépendantes du Ca²⁺, avec la stimulation de la pompe Na⁺/K⁺ ATPase et de voies activant les protéines iNOS (inductible Nitric Oxide Synthase) [Forst *et al.* 2000]. Ces deux voies étant connues pour être inhibées dans le DT1, notamment au niveau des reins [Nordquist *et al.* 2010] et du système nerveux [Mishra *et al.* 2010].

Meyer *et al.*, dans des expériences de combinaison du peptide C avec des érythrocytes isolés de patients diabétiques, ont observé que le peptide C facilite la clairance du glucose et induit le relargage d'ATP des érythrocytes. Ce phénomène est un stimulus connu pour induire la dilatation des vaisseaux sanguins par le NO (Nitric Oxide), via l'activation de GLUT1 (GLUCose Transporter type 1) [Meyer *et al.* 2008]. Ces auteurs suggèrent que le peptide C permette l'entrée du glucose dans les

érythrocytes, qui, contrairement aux autres cellules, ne possèdent pas de récepteur à l'insuline et donc ne répondent pas à l'insuline.

b. Rôle de l'insuline

L'insuline joue un rôle prépondérant dans l'homéostasie énergétique au niveau glucidique, lipidique et protéique. Elle oriente ces trois grands métabolismes dans le sens de l'anabolisme et s'oppose aux effets cataboliques de nombreux autres facteurs [Magnan *et al.* 2005].

Cette hormone a un rôle central dans l'équilibre glucidique ; contrairement aux hormones hyperglycémiantes, l'insuline est la seule hormone hypoglycémiante de l'organisme. Elle permet de diminuer la glycémie en favorisant l'entrée du glucose dans les différents organes de stockage que sont le foie, le tissu adipeux et le muscle. Pour cela, l'insuline va se fixer sur ses récepteurs (les IRs (Insulin Receptors)) présents au niveau des membranes des cellules hépatiques, adipeuses et musculaires. Son récepteur est formé de deux unités α extracellulaires sur lesquelles se fixe l'insuline. Ces deux unités α sont reliées par des ponts disulfures, entre elles d'une part, et à deux unités β d'autre part. Les unités β sont à la fois transmembranaires et intracellulaires. L'activation de l'IR par l'insuline entraîne la phosphorylation de protéines intracytoplasmiques comme l'IRS-1 (Insulin Receptor Substrate-1). Ce dernier va activer la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) qui, via une cascade d'activation, va permettre la translocation des transporteurs de glucose (GLUT4 dans le muscle strié et le tissu adipeux, GLUT2 dans le foie, le rein, l'intestin et les cellules β -pancréatiques ou GLUT3 dans les neurones et le placenta) des vésicules de stockage jusqu'à la membrane plasmique et ainsi augmenter la perméabilité au glucose des membranes des cellules cibles. L'insuline permet donc l'entrée intracellulaire de glucose et son utilisation par les tissus insulinosensibles (Figure 9).

L'insuline favorise la mise en réserve du glucose en diminuant sa libération par le foie via l'inhibition de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse et la stimulation de la glycogénèse et de la glycolyse (Figure 9).

Elle stimule également le stockage des lipides en augmentant les concentrations d'AG plasmatiques dans le tissu adipeux en stimulant leur captation

et leur conversion en TG dans le foie (lipogenèse). Elle diminue également la lipolyse du tissu adipeux (Figure 9).

L'insuline contribue aussi à la rétention protéique dans les tissus en favorisant l'entrée des AA dans les cellules hépatiques et musculaires.

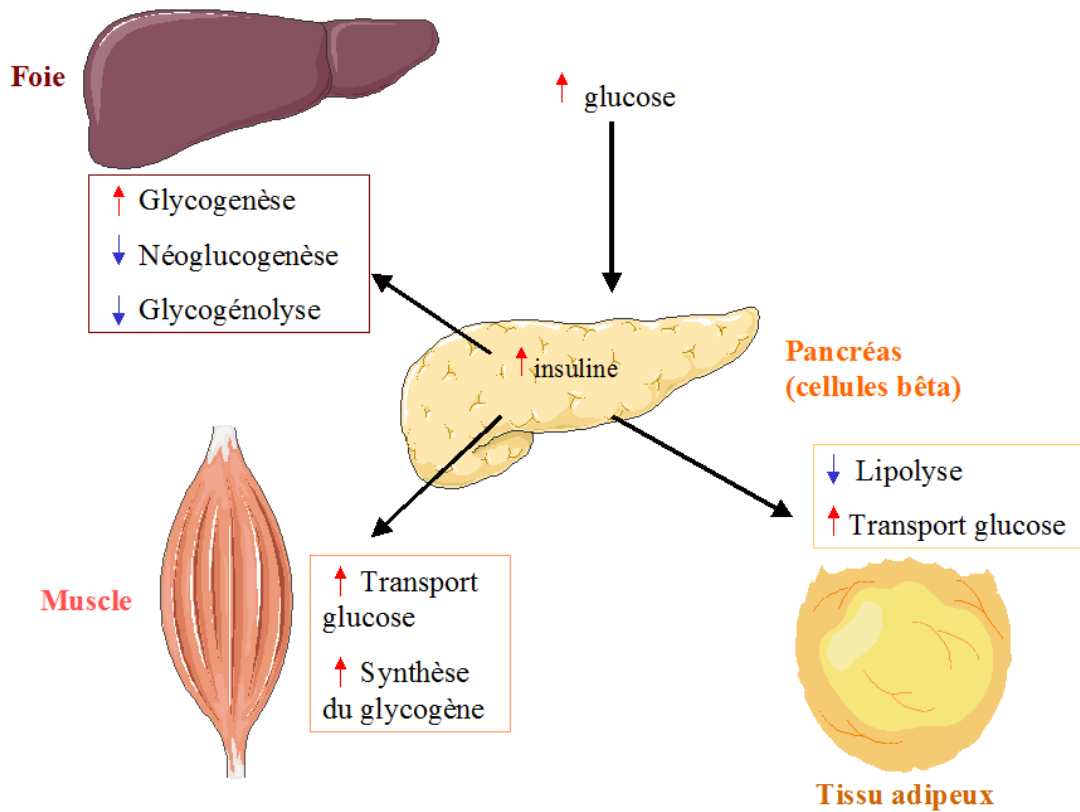


Figure 9 : Rôles de l'insuline dans le métabolisme glucidique.

c. Régulation de la sécrétion d'insuline

Le contrôle de la sécrétion d'insuline se fait de façon très fine à la fois par le contrôle de la concentration en glucose et par le contrôle de la sécrétion d'insuline elle-même [Magnan *et al.* 2005]. Il existe des modulateurs hormonaux ou nerveux qui permettent d'atténuer ou d'amplifier la sécrétion d'insuline. En effet, la sécrétion d'insuline est contrôlée par des substrats circulants tels que le glucose, les AG et les AA, par des facteurs modulateurs via l'axe entéro-insulaire, par les hormones insulaires tels que le glucagon et la somatostatine, par diverses hormones et cytokines telles que la GH, la prolactine, les hormones thyroïdiennes, les adipokines et également par le système nerveux sympathique et parasympathique (Figure 10).

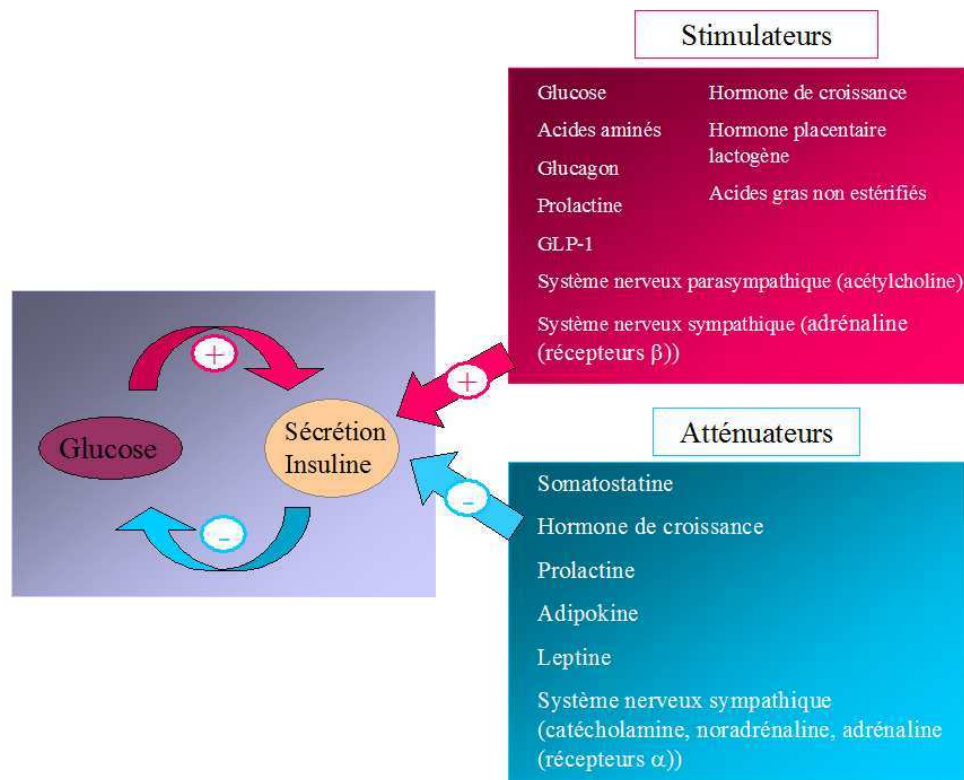


Figure 10 : Principaux facteurs stimulateurs et atténuateurs de la sécrétion d'insuline (D'après Magna et al.2005).

i. Rôle du glucose

Le glucose est le principal sécrétagogue de l'insuline et un régulateur potentiel de l'activité de la cellule bêta. Lorsque l'organisme reçoit un apport en glucose, ce

dernier va entrer dans les cellules β -pancréatiques via le transporteur GLUT1 (ou GLUT2 chez les rongeurs). Le glucose va alors être phosphorylé par la glucokinase lors de la glycolyse. Cette voie de dégradation du glucose va produire du pyruvate qui va alors entrer dans les mitochondries où il va rejoindre le cycle de Krebs, entraînant une production d'ATP. Cette dernière va engendrer une augmentation du ratio ATP/ADP dans le cytoplasme. Les canaux potassiques ATP-dépendants (KATP) de la membrane plasmique vont alors se fermer, provoquant ainsi la dépolarisation de la membrane plasmique et l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants. Cette ouverture va permettre l'influx de Ca^{2+} extracellulaire, entraînant l'exocytose des granules de sécrétion contenant l'insuline (Figure 11). L'insuline et le peptide C sont alors sécrétés dans la veine pancréatico-duodénale qui les conduit directement au foie, lequel en conserve près de 50%. Le reste de l'insuline est distribué dans l'ensemble de l'organisme. Cette voie de sécrétion de l'insuline est dépendante des canaux KATP.

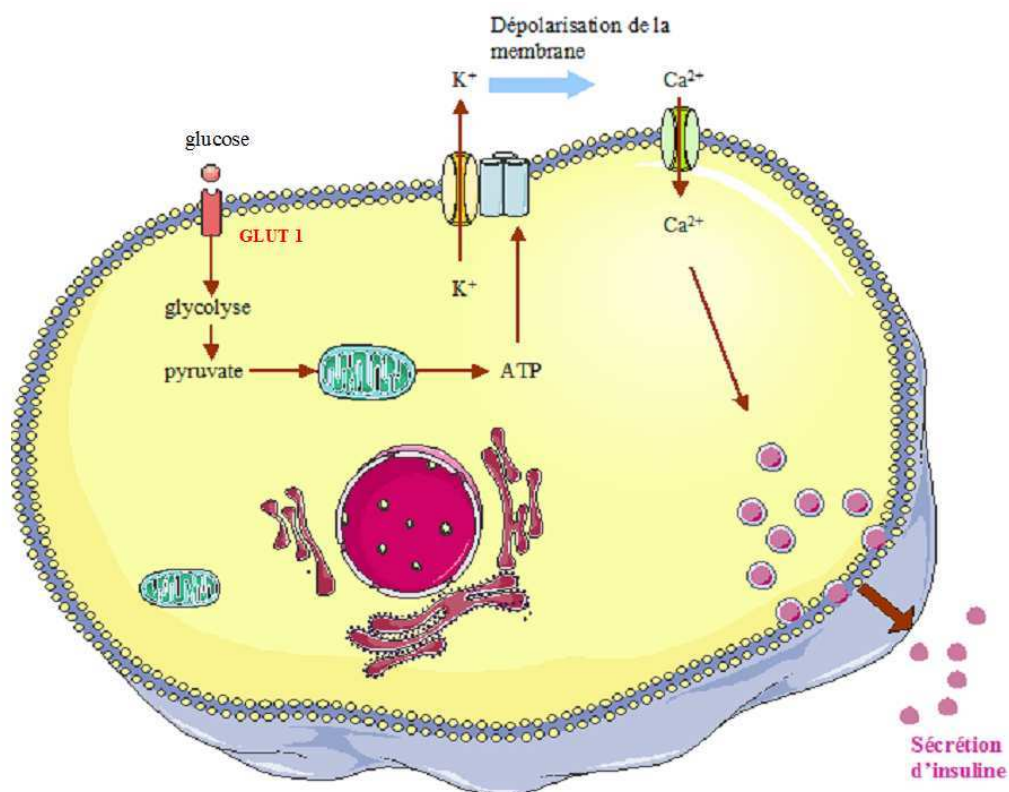


Figure 11 : Stimulation de la sécrétion d'insuline par le glucose via la voie dépendante des canaux K^+ sensibles à l'ATP dans les cellules β -pancréatiques.

L'action du glucose passe également par la stimulation de l'expression du gène de l'insuline et par son action sur la stabilité des ARNm (Acide RiboNucléique messenger) [Docherty *et al.* 1994]. L'effet du glucose ne s'exerce pas directement par sa fixation sur des régions activatrices mais nécessite son interaction, et plus particulièrement celle de ses métabolites, avec des facteurs de transcription, notamment PDX1 [Sasson *et al.* 1993].

La sécrétion d'insuline en réponse au glucose est composée de 2 phases. La première phase, dite « précoce », débute 1 minute après l'entrée du glucose dans l'organisme, atteint un pic 3 à 5 minutes après et dure environ 10 minutes. La seconde phase débute après 10 minutes et persiste tant que la glycémie reste élevée. C'est un phénomène oscillatoire avec des impulsions relativement stables et une amplitude variable.

ii. Stimulateurs et atténuateurs de la sécrétion d'insuline

La régulation de la sécrétion d'insuline, par les molécules autres que le glucose, passe par des voies indépendantes des canaux KATP. En effet, ces molécules, en se fixant sur leurs récepteurs spécifiques, vont activer des protéines G (Gq, GPR40, Gs ou Gi) (Figure 12). L'activation de la protéine Gq va entraîner l'activation de la PLC (Phospholipase C) qui va activer l'IP3 (inositol 3-P) et le DAG (DiAcylGlycerol). L'activation de l'IP3 va entraîner la sortie du Ca^{2+} provenant du réticulum endoplasmique vers le cytosol, contribuant ainsi à l'exocytose des granules contenant l'insuline. L'activation de la protéine Gs et de la protéine Gi va permettre la production d'AMPc à partir d'ATP. L'AMPc va alors activer la PKA (Phosphokinase A) qui, à son tour, va induire l'exocytose des granules de sécrétion (Figure 12).

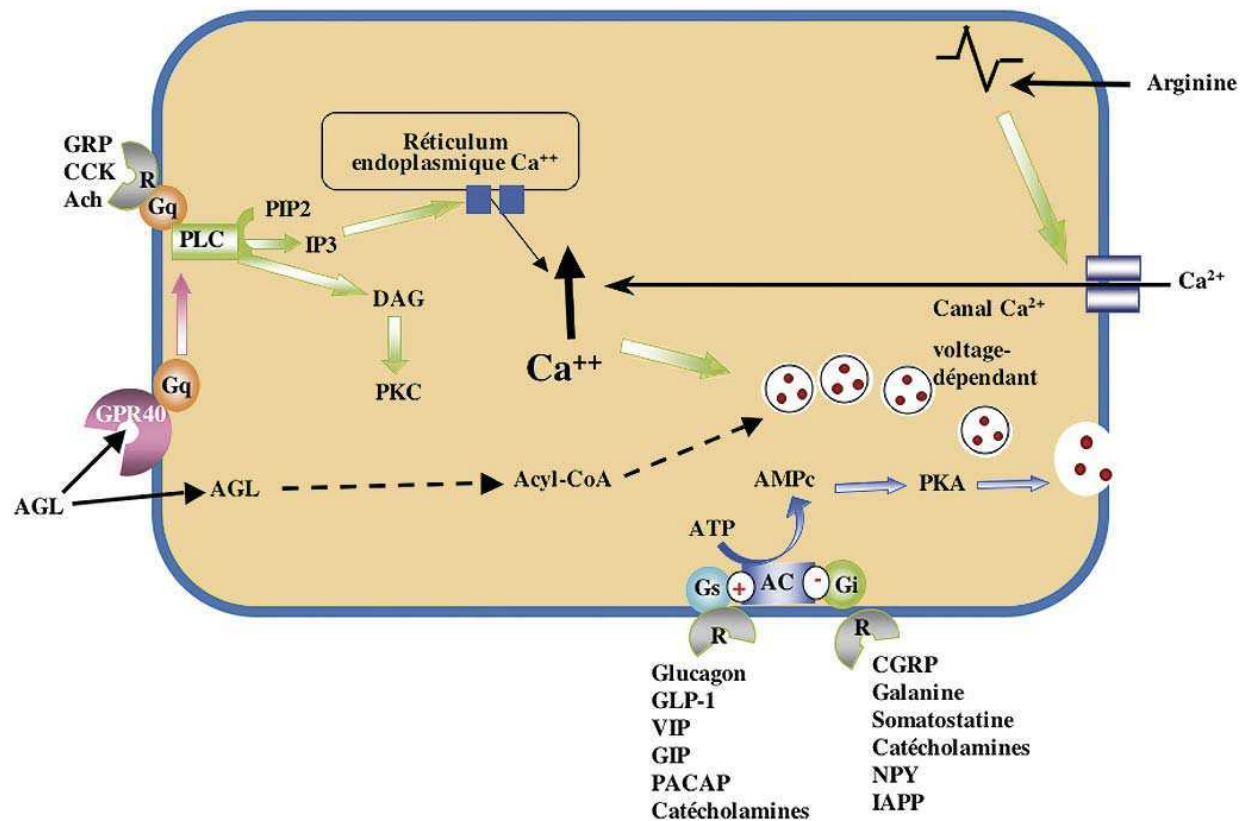


Figure 12 : Stimulation de la sécrétion d'insuline par des voies indépendantes des canaux K⁺ sensibles à l'ATP, ou amplificatrices. VIP : vasoactive intestinal peptide ; GRP : gastrin releasing polypeptide ; CCK : Cholécystokinine ; NPY : neuropeptide Y ; CGRP : calcitonin gene-related peptide ; GIP : gastric inhibitory polypeptide ; GLP-1 : glucagon-like peptide-1 ; AGL : acides gras libres ; PACAP : pituitary adenylate cyclase activating polypeptide ; IAPP : islet amyloid polypeptide (Magnan et al. 2005).

Stimulateurs de la sécrétion d'insuline :

Le glucagon, en plus de ses différents effets au niveau de la glycémie, présentés dans le chapitre II.3 de l'introduction, stimule la sécrétion d'insuline en agissant de façon paracrine ou endocrine [Magnan *et al.* 2005] (Figure 12). En activant la sécrétion d'insuline, le glucagon permet, de façon indirecte, la synthèse et la libération du glucose présent dans le foie favorisant ainsi l'entrée dans les autres cellules du glucose produit par voie hépatique.

Les incrétines sont des hormones produites par l'intestin à la suite de l'ingestion de nutriments et ont un rôle insulino-tropique important [Phillips *et al.* 2011]. Les deux incrétines principales sont le GLP-1 (Glucagon-Like Peptide-1),

codé par le gène du glucagon et le GIP (Gastric Inhibitory Polypeptide). Le GLP-1 et le GIP stimulent la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, activent la transcription du gène de l'insuline et augmentent la stabilité des ARNm via l'AMPC (Adénosine MonoPhosphate cyclique) (Figure 12). Le GLP-1 stimule également l'expression de PDX1 et possède des propriétés anti-apoptotiques [Farilla *et al.* 2002]. Les incrétines modulent également la disposition en glucose post-prandial en inhibant la sécrétion du glucagon, en retardant la vidange gastrique et en augmentant la sensibilité à l'insuline périphérique. La réponse des incrétines représente environ 70% de l'ensemble de l'insuline sécrétée suite à l'administration de glucose par voie orale [Phillips *et al.* 2011].

D'autres hormones telles que la GH, la prolactine et l'hormone placentaire lactogène stimulent également la transcription du gène de l'insuline. Une étude réalisée par Park *et al.* montre qu'une augmentation de la concentration en prolactine stimule la sécrétion d'insuline en réponse au glucose via une augmentation de la masse de cellules β -pancréatiques et de la sensibilité à l'insuline [Park, Kim, et al. 2011 258 /id].

L'effet de l'insuline elle-même est plus controversé. En effet, des études ont montré que l'insuline exerçait un rétrocontrôle négatif sur l'expression de son gène suivant une régulation autocrine et paracrine [Khan *et al.* 2001] mais d'autres données ont conduit à réévaluer le rôle de l'insuline dans le fonctionnement de la cellule bêta. En effet, d'après des études d'invalidation spécifique du gène du récepteur de l'insuline ou de l'IGF-1 dans la cellule bêta, l'insuline serait essentielle au maintien de sa sécrétion [Leibiger *et al.* 2002].

Les AGL (ou AG non estérifiés) sont des substrats énergétiques majeurs de la cellule β -pancréatique. Ils stimulent l'insulino-sécrétion en présence de concentrations normales ou élevées en glucose. De plus, les AGL jouent un rôle important dans la compensation des cellules bêta dans la résistance à l'insuline et dans leur dysfonctionnement lors d'un DT2 [Nolan *et al.* 2006] [McGarry 2002], [Prentki *et al.* 2002]. Il a été mis en évidence que la privation en AG dans le tissu pancréatique entraîne la perte de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Ce processus est réversible grâce à un apport en AGL exogènes [Stein *et al.* 1996]. Cependant, les AGL peuvent être toxiques s'ils sont exposés de façon prolongée aux

cellules bêta, en particulier lorsqu'ils sont associés à une hyperglycémie. En effet, une exposition chronique à des concentrations élevées d'AG entraîne une accumulation d'acétyl-Coenzyme A (acétyl-CoA) dans les cellules bêta du pancréas qui se traduit par une réduction de la biosynthèse et de la sécrétion d'insuline et par la disparition de 50% des cellules bêta par apoptose ; ce phénomène est appelé lipotoxicité [Poitout *et al.* 2006] [Girard 2005] (Figure 12).

Par ailleurs, la longueur de la chaîne d'AG ainsi que leur degré d'insaturation influent sur l'effet insulino-sécréteur des cellules bêta, de façon positive et négative, respectivement. En effet, des études ont montré qu'un AG à longue chaîne, tel que l'acide linoléique (C18:2), amplifie la sécrétion d'insuline en réponse au glucose de 5,3 fois alors qu'un AG à chaîne courte, tel que l'acide octanoïque (C8:0) ne l'augmente que de 3,4 fois. De plus, quand le nombre de double liaisons dans l'AG C18 est diminué à 1 ou 0 (exemple l'AG oléique et stéarique), l'augmentation de la sécrétion d'insuline passe de 9,4 ou 21, respectivement [Stein *et al.* 1997].

Les AA, en majorité, sont capables de stimuler la sécrétion d'insuline, notamment l'arginine, la leucine et la lysine. Ils stimulent de façon modeste la sécrétion d'insuline en présence de faibles concentrations en glucose, mais beaucoup plus fortement en présence de concentrations élevées. Dans ce cas, ce sont des amplificateurs très efficaces de la réponse sécrétoire à l'hexose. Le mécanisme d'action des AA varie en fonction de leurs propriétés biochimiques. Par exemple, la leucine est métabolisée par la cellule β -pancréatique et possède un effet insulino-sécréteur via des voies semblables à celle du glucose [Newsholme, Bender, *et al.* 2007 257 /id].

Le système nerveux parasympathique est activé avant la prise alimentaire, ce qui constitue une phase dite « céphalique » de la sécrétion d'insuline. Le système nerveux anticipe l'élévation de la glycémie postprandiale en générant un pic précoce, mais modeste, de sécrétion d'insuline avant même une augmentation réelle de la glycémie. Cette activation fait intervenir plusieurs neurotransmetteurs tels que l'acétylcholine, le VIP, le GRP et le PACAP (Figure 12) [Thorens 2011 256 /id].

Les inhibiteurs de la sécrétion d'insuline :

La somatostatine est impliquée dans la régulation des métabolismes au niveau pancréatique, intestinal et hypothalamique.

Au niveau pancréatique, elle est sécrétée par les cellules delta et exerce un contrôle paracrine, sur les cellules bêta et alpha, de la production d'insuline et de glucagon, induisant ainsi une forte inhibition de la sécrétion d'insuline.

Au niveau intestinal, la somatostatine exerce une action inhibitrice sur la sécrétion des hormones peptidiques intestinales tels que le VIP, la gastrine, la cholécystokinine, le GIP (Gastric Inhibitory Peptide) et la sécrétine. Elle diminue également les sécrétions exocrines (sucs digestifs) de l'intestin et du pancréas, l'activité motrice et l'irrigation sanguine intestinale.

Au niveau hypothalamo-hypophysaire, la somatostatine inhibe la synthèse de la GH et de la TSH (Thyroid Stimulating Hormone). Dans le système nerveux central, la somatostatine est un neurotransmetteur sécrété par les neurones sensoriels rétiniens et auditifs ainsi que par le nerf vague et par le système nerveux sympathique. Cette hormone est impliquée dans la régulation du comportement alimentaire, notamment dans la prise de nourriture. Son effet passe par une diminution de la synthèse d'AMPc consécutive à l'inhibition de la protéine Gi (Figure 12) [Strowski *et al.* 2000].

Autres hormones : La GH et la prolactine inhibent la sécrétion d'insuline mais les mécanismes précis sont mal connus [Sekine *et al.* 1998]. L'étude réalisée par Park et al. montre en effet qu'une concentration trop élevée en prolactine induit une résistance à l'insuline et diminue la capacité de sécrétion d'insuline des cellules β -pancréatiques chez les souris diabétiques [Park, Kim, et al. 2011 258 /id].

La leptine est une cytokine produite par les adipocytes et joue un rôle majeur dans la régulation du métabolisme énergétique en modifiant la prise alimentaire et la dépense énergétique au niveau de l'hypothalamus. Elle inhibe également la sécrétion d'insuline en se fixant à ses récepteurs (ObRB) présents au niveau de la membrane plasmique des cellules β -pancréatiques [Seufert 2004]. Cette hormone active la voie de signalisation JAK/STAT et son effet passerait par l'activation de la phosphodiesterase 3B (via l'activation de la PI3K) qui est une enzyme catalysant l'hydrolyse de l'AMPc. La leptine a également un effet inhibiteur sur l'expression du

gène de l'insuline. Cependant, le rôle de la leptine est controversé car selon différentes études, elle aurait un effet inhibiteur, neutre ou activateur de la biosynthèse de l'insuline ; mais, il semblerait que ce soit l'effet inhibiteur qui prédomine car certaines séquences inhibitrices de la transcription du gène de l'insuline ont été identifiées [Seufert 2004].

Le système nerveux sympathique inhibe la sécrétion d'insuline au cours du stress. Son activation joue un rôle physiologique important, notamment au cours d'un exercice physique. En effet, la noradrénaline, principal neurotransmetteur du système nerveux sympathique, se fixe au niveau des récepteurs qui sont des RCPG activés, de préférence, par leurs ligands endogènes, les catécholamines (adrénaline et noradrénaline). Il existe deux sous-types de récepteurs des catécholamines au niveau des cellules β -pancréatiques : α_2 et β_2 [Chan 1995]. Dans le système nerveux sympathique, les agonistes β adrénergiques stimulent la sécrétion d'insuline alors que les agonistes α_2 adrénergiques l'inhibent. Cependant, il existe une prédominance de récepteurs α_2 adrénergiques au niveau des cellules β -pancréatiques, induisant ainsi un effet global inhibiteur de la sécrétion d'insuline [Ahren 2000].

5. Troubles de la glycémie

L'hyperglycémie est due à deux mécanismes plus ou moins bien connus que sont la résistance à l'insuline et les troubles de l'insulino-sécrétion. La part de chacun de ces mécanismes dans l'apparition de la maladie est plus ou moins importante avec un rôle *a priori* plus important pour les troubles de l'insulino-sécrétion.

a. Résistance à l'insuline ou insulino-résistance

Les mécanismes physiopathologiques de la résistance à l'insuline ne sont pas totalement compris mais on sait qu'ils jouent un rôle important dans le développement du DT2. La résistance à l'insuline apparaît 10 à 20 ans avant l'apparition du DT2 et est le meilleur prédicteur de la maladie. Lors d'un apport important en glucose dans le sang, le pancréas sécrète de l'insuline qui, via des récepteurs cellulaires (IRs et GLUTs), va permettre l'entrée du glucose dans les cellules musculaires, hépatiques et adipeuses permettant ainsi de stabiliser la glycémie. La résistance à l'insuline ou insulino-résistance correspond à

l'insensibilisation de ces récepteurs cellulaires à l'insuline. Cette dernière n'est donc plus capable de faire entrer le glucose dans les cellules, entraînant ainsi une accumulation du glucose dans le sang, d'où une hyperglycémie. Pour pallier ce défaut, le pancréas va augmenter de façon proportionnelle sa sécrétion d'insuline. Ceci permettra de maintenir une glycémie à un niveau normal. Avec le temps, le pancréas va s'affaiblir et ne produira plus suffisamment d'insuline pour compenser l'insulinorésistance, une IG va alors se développer, puis un DT2. Les personnes intolérantes au glucose affichent une glycémie supérieure à la normale mais pas suffisamment élevée pour être considérées comme diabétiques ; elles sont dites « pré-diabétiques ». Selon l'OMS et l'ADA, l'IG est définie par une glycémie comprise entre 1,40 et 2 g/L (entre 7,8 et 11,1 mmol/L) 2h après un test HGPO. L'IG est un stade fréquent de transition vers le DT2 ; 70% des personnes touchées par une IG développeront par la suite un DT2. C'est un problème qui semble en augmentation constante mais avec des zones et des populations diversement affectées. Chez les 20-79 ans, en 2005, 314 millions de personnes dans le monde étaient atteintes d'IG, et l'association mondiale contre le diabète estime qu'en 2025, au rythme actuel, 472 millions de personnes pourraient être touchées. Cette maladie semble être favorisée par des facteurs environnementaux délétères tels que la sédentarisation, une mauvaise alimentation, l'obésité ou des antécédents familiaux (voir le chapitre III.2).

L'insulinorésistance aurait une composante génétique puisqu'on la retrouve chez les enfants ayant une tolérance glucidique strictement normale mais ayant deux parents diabétiques non insulino-dépendants. Sur le plan métabolique, l'insulinorésistance fait suite à un excès de graisse au niveau des muscles et du tissu adipeux viscéral ; elle est donc souvent une conséquence de l'obésité. Le tissu adipeux viscéral libère une grande quantité d'AGL. Ces derniers favorisent la synthèse hépatique des TG et stimulent la néoglucogénèse hépatique. Au niveau musculaire, il existe une véritable compétition entre les AGL et le glucose pour être oxydé : les AGL sont oxydés en priorité, entraînant une production accrue d'acétyl-CoA qui inhibe en retour les enzymes de la glycolyse. L'énergie musculaire est donc fournie en priorité par l'oxydation des AGL et le stock de glycogène musculaire reste intact, ce qui réprime en retour la glycogène synthase. Le stockage et l'utilisation du glucose sont donc diminués au niveau musculaire. La stimulation de la néoglucogénèse hépatique et la diminution de l'utilisation du glucose dans les muscles conduisent à l'augmentation de la glycémie. Les anomalies de l'action de

l'insuline sur les tissus cibles se traduisent donc par une diminution du captage de glucose par les muscles et par une augmentation de la production hépatique de glucose. Elles sont liées à des défauts multiples dans les mécanismes de signalisation par le récepteur de l'insuline et dans des étapes régulatrices du métabolisme du glucose (transport, enzymes clés de la synthèse de glycogène ou de l'oxydation mitochondriale du glucose). Ces défauts «post-récepteurs» sont amplifiés par la présence d'une concentration augmentée d'AGL [Girard 2005].

Le mécanisme précis par lequel la résistance à l'insuline entraîne une défaillance des cellules β -pancréatiques n'est pas encore bien compris. Une hypothèse possible est que la cause de l'insulino-résistance (un excès d'AG) est directement responsable de la défaillance des cellules bêta ; c'est le phénomène de lipotoxicité.

La résistance à l'insuline peut être estimée par des mesures directes telles qu'un clamp hyperinsulinémique-euglycémique ou par des mesures dynamiques indirectes telles qu'un IVGTT (IntraVenous Glucose Tolerance Test), un FSIIVGTT (Frequently Sampled Intravenous Glucose Tolerance Test) ou un HGPO. Il est également possible d'estimer la résistance à l'insuline par des mesures indirectes grâce à l'utilisation d'index tels que le HOMA-IR (Insulinémie à jeun (mU/ml) x (glycémie à jeun (mmol/L)/22.5) ou le QUICKI (QUAntitative Insulin-sensitivity Check Index) ($1/((\log \text{insulinémie à jeun (mU/ml)}) + (\log \text{glycémie à jeun (mg/dl)}))$). Ces index sont plus couramment utilisés dans les études épidémiologiques [Rabasa-Lhoret *et al.* 2001].

b. Troubles de l'insulino-sécrétion

La sécrétion d'insuline peut être altérée à cause d'un défaut de sécrétion ou bien un défaut de la masse de cellules bêta.

Des estimations quantitatives d'îlots et de cellules bêta ont été réalisées post-mortem sur des pancréas de patients diabétiques et comparés avec ceux de sujets non diabétiques [Clark *et al.* 1988] [Stefan *et al.* 1982]. Dans ces études, il a été montré que la quantité de cellules bêta issues de sujets diabétiques est similaire ou réduite de 30% quand elle est accompagnée de dépôts amyloïdes. Une étude plus récente sur des autopsies de sujets diabétiques reporte un déficit de la masse de cellules β -pancréatiques allant de 0 à 65% ainsi qu'une augmentation de l'apoptose de ces cellules [Matveyenko & Butler 2008 259 /id]. Clark *et al.* ont également noté

une légère augmentation du nombre de cellules alpha ainsi qu'une augmentation de cellules provenant du canal pancréatique (précurseurs des cellules bêta) qui sont plus sensibles à l'insuline chez les sujets ayant un DT2 comparés aux sujets non diabétiques. Ceci suggère que la néogenèse des cellules bêta est augmentée dans le DT2. Il a également été mis en évidence que le changement du nombre de cellules bêta est indépendant de la durée du DT2 [Clark *et al.* 1988]. La réduction du nombre de cellules bêta ne semble pas être le facteur le plus important engendrant la survenue d'un DT2. En effet, il a été montré chez le babouin qu'une réduction de 50% de la masse des cellules bêta est nécessaire pour induire une hyperglycémie [Clark *et al.* 1988].

D'autres études suggèrent que les troubles de l'insulino-sécrétion seraient plutôt dus à une dysfonction des cellules bêta. En effet, des études ont mis en évidence qu'une concentration faible en glucose (6 à 8 mmol/L) provoquait une augmentation de la sécrétion d'insuline à partir d'une petite population de cellules bêta isolées [Pipeleers 1992] [Lewis *et al.* 1988]. Ces travaux ont également montré qu'une concentration en glucose plus élevée (> 8 mmol/L) entraînait le recrutement de plus de cellules et augmentait la sécrétion en insuline des cellules qui répondaient initialement [Pipeleers 1992] [Lewis *et al.* 1988]. Au sein même d'une population de cellules bêta, il existe une différence dans la réponse aux variations de glycémie. Ceci permettrait d'avoir une large réserve de cellules capables de sécréter de l'insuline et qui peuvent être mobilisées en cas de condition d'insulino-résistance. Dans le DT2, la masse initiale de cellules bêta n'est peut-être pas adéquate pour compenser les changements de la sécrétion d'insuline.

La perte de sécrétion insulinique au cours de l'évolution du DT2 serait principalement due aux « gluco et lipotoxicités ». Indépendamment des anomalies primitives de la cellule bêta, le diabète lui-même et ses conséquences métaboliques altèrent le potentiel insulino-sécréteur. Cette altération porte à la fois sur la fonction (avec une réversibilité possible) et sur le stock de cellules bêta (étape de non-retour). L'hyperglycémie chronique crée des conditions de « glucotoxicité » (notion développée dans le chapitre V.2.a) et des altérations métaboliques aiguës, une « lipotoxicité » [Avignon *et al.* 2001]. La dysfonction des cellules bêta pourrait également être, en partie, causée par l'IAPP (Islet Amyloid PolyPeptide). En effet, ce peptide amyloïde est exclusivement exprimé dans les cellules bêta et est co-sécrété avec l'insuline, suggérant un rôle important dans le métabolisme glucidique

[Westermarck *et al.* 2011]. Les dépôts de peptide amyloïde sont associés à une diminution du volume des îlots suite à une réduction de la masse des cellules bêta [Westermarck *et al.* 2011]. Ce processus serait responsable d'une diminution de la réponse insulínique dans le DT2. Cependant, ces résultats restent controversés.

L'estimation de la sécrétion d'insuline peut être réalisée par des méthodes simples telles que la mesure de l'insulinémie à jeun ou de la glycémie à jeun, des mesures de l'augmentation en insuline plasmatique à jeun 30 min après un HGPO ou encore de l'augmentation en insuline ou en peptide-C après une stimulation par le glucagon. Mais ces mesures ne permettent pas de distinguer les différents diabètes (DT1, DT2, diabète de type MODY ou autre) [Vague *et al.* 2002]. D'autres mesures de la sécrétion d'insuline, plus précises et plus largement reconnues, sont également utilisées telles qu'un clamp hyperglycémique ou un IVGTT, cependant, ces méthodes nécessitent la présence d'un personnel nombreux et qualifié, ce qui le rend difficile à utiliser en étude de population [Archambeaud *et al.* 2001]. Pour pallier ce problème, des méthodes plus simples et pouvant être utilisées en routine sont employées ; ce sont des méthodes indirectes de calcul d'index tels que le HOMA-B ($(20 \times \text{Insulinémie à jeun (mU/ml)}) / (\text{glycémie à jeun (mmol/L)} - 3,5) \text{ (en \%)})$) et le QUICKI. Par ailleurs, des études ont mis en évidence que l'index HOMA-B permet une meilleure estimation de la sécrétion d'insuline par les cellules bêta que l'IVGTT ou le clamp hyperglycémique. En effet, le HOMA-B estime la sécrétion d'insuline indépendamment des changements de la sensibilité à l'insuline [Matthews *et al.* 1985]. Or, la sécrétion d'insuline est souvent diminuée au moment du diagnostic du DT2 et continue de diminuer avec l'aggravation de la maladie.

V. Complications du diabète de type 2

Les désordres métaboliques dus au DT2 tels que l'hypo ou l'hyperglycémie peuvent avoir des conséquences néfastes sur la santé des personnes atteintes et nécessitent une prise en charge rapide des patients. Il existe des complications aiguës du DT2 telles qu'un coma hyperosmolaire, une hypoglycémie ou une acidocétose ainsi que des complications chroniques, notamment macro et microvasculaires, essentiellement dues à une hyperglycémie prolongée.

1. Complications aiguës

L'acidocétose diabétique : suite à un dysfonctionnement des cellules bêta, un défaut de sécrétion d'insuline apparaît. Le glucose ne peut donc plus entrer dans les cellules adipeuses, musculaires et hépatiques, obligeant l'organisme à utiliser un autre carburant : les AG. La dégradation des AG entraîne la formation de corps cétoniques (l'acétone, l'acide bêtaoxydobutyrique et l'acide diacétique) qui vont augmenter l'acidité de l'organisme ; c'est l'acidocétose diabétique. Il s'agit d'un état qui peut être fatal mais qui est plutôt rare dans le DT2.

Le glucose ne pouvant plus entrer dans les cellules de l'organisme, on observe une élévation de la glycémie dans les urines (glycosurie) (lorsque la glycémie est supérieure à 1,8 g/L, elle dépasse les capacités de réabsorption rénale) provoquant une diurèse osmotique, c'est-à-dire une augmentation du volume urinaire éliminé. Cette perte d'eau pour l'organisme est à l'origine de ce que l'on appelle une hyperosmolarité extracellulaire. Ce phénomène entraîne une plasmolyse des cellules et est responsable d'un degré variable de déshydratation de la cellule et secondairement d'une hypovolémie (diminution de la quantité de sang circulant) ainsi que d'une perte d'AA et d'électrolytes.

Le coma hyperosmolaire : la déshydratation massive globale de l'organisme, l'hyperglycémie majeure ainsi que l'hyperosmolarité plasmatique peuvent entraîner un coma hyperosmolaire lorsqu'un DT2 a brutalement décompensé par une infection, un stress chirurgical ou une corticothérapie. Le coma hyperosmolaire est plus fréquent chez le sujet âgé qui ne se réhydrate pas en présence d'une polyurie osmotique. Dans ce cas, il s'agit là d'une véritable urgence médicale qui est fatale dans plus de 50% des cas [Kitabchi *et al.* 2006].

L'hypoglycémie survient dans les muscles striés et les tissus adipeux, en l'absence d'insuline. Cette déficience en glucose dans l'adipocyte entraîne des compensations métaboliques conduisant à l'hydrolyse des TG et la libération d'AG qui sont ensuite oxydés par le foie et transformés en dérivés cétoniques. L'hypoglycémie est souvent due à une mauvaise prise de traitement mais est assez rare chez les personnes atteintes de DT2 car elles gèrent leur diabète en contrôlant soigneusement leur régime.

Ces divers troubles participent à la genèse de microangiopathies, de macroangiopathies et de neuropathies périphériques.

2. Complications chroniques

L'hyperglycémie chronique peut avoir des effets néfastes sur l'organisme ; on parle de glucotoxicité. Cette dernière passe par des processus hémodynamiques et métaboliques telles que la formation de produits avancés de glycation ou glycosylation (AGE (Advanced Glycation Endproducts)), la production importante d'espèces réactives de l'oxygène (ROS (Reactive Oxygen Species)) ainsi que la voie du polyol, contribuant aux changements histopathologiques caractéristiques dans les vaisseaux de personnes diabétiques [Yamagishi *et al.* 2005] [Brownlee 2001]. Les complications vasculaires (micro et macroangiopathies) sont les causes principales de la morbidité et de la mortalité chez les patients atteints de DT2 [Nishikawa *et al.* 2007].

a. Glucotoxicité

i. Espèces réactives de l'oxygène (ROS)

L'utilisation du glucose par les cellules se fait de façon aérobie grâce à des réactions d'oxydo-réductions. Ces réactions font intervenir des oxydants (ou accepteurs d'électrons) et des réducteurs (ou donneurs d'électrons) et se déroulent au niveau de la chaîne de transport d'électron des mitochondries. Après une cascade d'oxydo-réduction, l'oxygène est l'accepteur final d'électron. Quatre électrons vont alors se fixer sur cet oxygène, conduisant à la production d'eau. Cependant, 2 à 3% de l'oxygène n'est pas réduit en eau. Il est dévié pour former des ROS [Koppenol 2001]. Ces ROS sont physiologiquement maintenus en équilibre par de nombreux systèmes anti-oxydants ; lorsqu'un déséquilibre apparaît entre les molécules pro et anti-oxydantes, en faveur des entités oxydantes, on parle de stress oxydant [Sies 1991]. Suite à une hyperglycémie, il y a augmentation de l'utilisation du glucose par les cellules et donc augmentation de la production de ROS. Ces derniers sont connus pour jouer un rôle important dans le développement de l'insulino-résistance, la dysfonction des cellules β -pancréatiques, l'intolérance au glucose et

donc du DT2 [Wright E Jr, Scism-Bacon, et al. 2006 260 /id]. De plus, le stress oxydant est un facteur d'inflammation important dans les vaisseaux sanguins, il peut donc être à l'origine de complications micro et macrovasculaires [Wright E Jr, Scism-Bacon, et al. 2006 260 /id].

ii. Produits avancés de glycation (AGEs)

En excès, le glucose interagit par sa fonction aldéhyde avec la fonction amine des AA des protéines pour former des bases de Schiff [Yamagishi *et al.* 2005]. Cette réaction est très rapide, mais réversible en raison de l'instabilité de l'aldimine. Dans un second temps, la base de Schiff subit un réarrangement moléculaire, appelé réarrangement d'Amadori, aboutissant à une liaison céto-amine (ou fructosamine) stable. Cette réaction lente est pratiquement irréversible. Ces produits glyqués sont connus sous le nom de "produits d'Amadori" et constituent les produits précoces de glycation. La réaction peut en effet se poursuivre. Les protéines glyquées subissent alors différentes modifications comme des fragmentations oxydatives et forment des intermédiaires réactifs comme les désoxyglucosones et la N-carboxyméthyl-lysine, capables de réagir entre eux et/ou avec d'autres protéines pour donner naissance, à long terme, à des produits stables, fluorescents, appelés "produits de glycation avancés" ou AGE. L'exemple le plus connu de cette glycosylation est la formation d'Hba1c.

Les conséquences de la glycation des protéines sont multiples car elles perdent certaines de leurs propriétés. La glycation va altérer l'activité enzymatique de différentes façons : (i) un résidu d'AA glyqué au voisinage du site actif de l'enzyme peut gêner l'association site actif-substrat et ainsi gêner la réaction enzymatique, (ii) des modifications de la conformation de l'enzyme, dues, par exemple, à la formation de liaisons entre les atomes (phénomène de réticulation), peut provoquer une modification du site actif et par conséquent supprimer les actions de l'enzyme, (iii) la glycation de certaines protéines des parois vasculaires peut leur faire perdre une partie de leurs propriétés mécaniques et les rendent ainsi résistantes aux enzymes. Par exemple, la résistance de certaines protéines aux enzymes, nécessaires au remodelage de la paroi, contribue à l'irréversibilité de l'épaississement de la paroi artérielle à l'origine de la vasoconstriction (diminution du diamètre des vaisseaux sanguins) et de la thrombose (formation de caillots dans les

vaisseaux). Ce phénomène diminue la fluidité du sang dans les vaisseaux. Par ailleurs, les phénomènes de réticulation touchent aussi les protéines avoisinantes (qui ne sont pas des AGEs) pouvant aboutir à la formation d'agrégats. En effet, des réactions chimiques entre des AGEs très réactifs et certaines protéines ont lieu, ce qui explique les dépôts de ces protéines dans la paroi artérielle, l'épaississement et l'obstruction de cette paroi, mais aussi ceux au niveau de la membrane basale, empêchant les échanges intercellulaires. De plus, les modifications structurales au niveau de la membrane basale peuvent masquer les sites de reconnaissance des protéoglycanes qui contrôlent la perméabilité des lames basales. Ainsi, la glycation dérègle le contrôle des échanges entre les vaisseaux et les cellules. L'assemblage des différentes molécules de la membrane basale est également perturbé par la glycation, ce qui fragilise la membrane et entraîne des fuites vasculaires. La glycation réduit également l'hydrolyse de protéines telles que le collagène constitutif des membranes basales, contribuant à l'épaississement irréversible de ces membranes. La fixation des AGEs sur leurs récepteurs spécifiques, les RAGEs (Receptor of Advanced Glycation Endproducts), engendre un stress oxydatif dans les différents types cellulaires. Ce stress va induire une inflammation, qui, à son tour, va activer les macrophages. Ces derniers vont alors sécréter des cytokines et des facteurs de croissance, entraînant la prolifération des cellules endothéliales et la destruction accrue des protéoglycanes. Ce phénomène va induire, d'une part, des vasoconstrictions et des thromboses, et d'autre part, une hyperperméabilité vasculaire [Yamagishi *et al.* 2008].

iii. Voie du polyol

A l'état de normoglycémie, le glucose est transformé par l'hexokinase en glucose-6-P pour rejoindre la glycolyse et la voie des pentoses phosphates. Dans le cas d'une hyperglycémie, l'hexokinase est saturée ; le glucose va donc s'accumuler dans les tissus périphériques et activer la voie des polyols. Dans cette voie, le glucose est transformé, grâce à l'aldose réductase, en sorbitol [Burg 1995]. Ce dernier ne pouvant franchir la membrane plasmique, il va s'accumuler dans la cellule et augmenter la pression osmotique, entraînant une hyperosmolarité intracellulaire [Burg 1995]. Le sorbitol et le fructose s'accumulent dans les tissus, créant ainsi une

déficience en inositol et un déséquilibre du potentiel d'oxydo-réduction de la cellule dans le sens réducteur.

iv. Conséquences de la glucotoxicité

L'hyperglycémie, via les AGEs, les ROS et la voie du polyol, va déstabiliser les membranes des cellules qui composent les vaisseaux et modifier la résistance mécanique de la paroi artérielle, ainsi que leur comportement vis-à-vis de certaines lipoprotéines et la coagulation artérielle. Les conséquences de l'hyperglycémie touchent principalement l'endothélium des vaisseaux, qui est modifié et endommagé, ainsi que la lame basale. On constate les effets suivants : (i) l'hyper-insulinémie (état "prédiabétique") modifie les réactions des cellules endothéliales, (ii) l'hyperglycémie augmente la viscosité sanguine et modifie chimiquement certaines protéines, (iii) l'insuline et le glucose modifient profondément le métabolisme des lipides qui à leur tour agissent sur l'endothélium des vaisseaux, (iv) la synthèse de facteurs de croissance tels que l'IGF-1 ou l'EGF, qui agissent de façon paracrine ou systémique, est fortement perturbée tout comme la réactivité des cellules endothéliales à leur égard.

On distingue deux types de complications principales, les complications microvasculaires touchant les petits vaisseaux et les complications macrovasculaires touchant les grands vaisseaux. Les complications, qu'elles soient micro- ou macrovasculaires, justifient la prise en compte de leur gravité comme une priorité en santé publique : en effet, ces complications représentent la 1^{ère} cause de cécité acquise, d'insuffisance rénale terminale, de neuropathie, d'amputation de membre non-traumatique et 25 à 35% des accidents vasculaires-cérébraux et des coronaropathies [Fowler 2011].

b. Complications microvasculaires

Les complications microvasculaires apparaissent environ 5 ans après le début du DT2 et peuvent être lourdes de conséquences. Le risque de développer une complication microvasculaire suite à un DT2 dépend à la fois de la durée et de la sévérité de l'hyperglycémie.

Une des complications les plus importantes est l'atteinte des yeux (rétinopathie). Le diabète est la première cause de cécité chez les personnes de

moins de 50 ans dans les pays développés, en effet, 2% des personnes diabétiques sont aveugles et 10% ont une baisse de l'acuité visuelle. Le développement d'une rétinopathie diabétique va dépendre à la fois de la sévérité de l'hyperglycémie et à la fois de la présence d'une hypertension artérielle. Elle peut commencer à se développer 7 ans avant le diagnostic de diabète chez les patients ayant un DT2 [Fong *et al.* 2004].

Une atteinte des reins (néphropathies) est également souvent présente chez les personnes diabétiques car la concentration des micro-vaisseaux sanguins dans le rein l'expose particulièrement aux conséquences du diabète. La néphropathie touche environ 30% des sujets diabétiques en France et peut évoluer jusqu'à une insuffisance rénale, touchant près de 3% des diabétiques. Dans ce dernier stade, les patients doivent subir des dialyses voire une greffe rénale. Près de 40% des patients débutant une dialyse sont diabétiques (source Direction Générale de la Santé – Prévention des complications du diabète – juillet 2005).

Les individus diabétiques sont également souvent touchés par une atteinte des nerfs (neuropathies) qui touche 1 personne diabétique sur 2 après une quinzaine d'années d'évolution de la maladie. Elle se caractérise par des douleurs, des pertes de sensibilité et des picotements principalement aux extrémités des membres.

Le diabète est également la première cause d'amputation non post-traumatique en France. En effet, une perte de sensibilité au niveau du pied due à une mauvaise vascularisation peut entraîner des ulcères dont l'infection peut nécessiter une amputation. Chaque année en France, 10 000 amputations sont dues au diabète.

c. Complications macrovasculaires

Le DT2 est très fréquemment associé à d'autres facteurs de risques vasculaires dans le développement des atteintes des gros vaisseaux sanguins, telle que l'athérosclérose (Figure 13). Les stades précoces du DT2, comme l'IG, sont également directement reliés à la formation de lésions athérosclérotiques. Ces atteintes constituent des macro-angiopathies aboutissant au décès de 75% des malades aux Etats-Unis. L'athérosclérose associe l'épaississement de la paroi des grosses artères (aorte abdominale, artères coronaires, artères cérébrales, artères des jambes) et leur obstruction par des plaques d'athérome. Elle résulte d'une inflammation chronique et d'une lésion de la paroi artérielle au niveau du système vasculaire coronaire ou périphérique. En réponse à cela, les lipides oxydés

provenant des particules de LDL (Low-Density Lipoproteins) s'accumulent dans la paroi endothéliale des artères. Les monocytes vont ensuite s'infiltrer dans cette paroi et se différencier en macrophages qui vont accumuler des lipides oxydés et former des cellules spumeuses. Une fois formées, ces cellules spumeuses vont stimuler la prolifération des macrophages et l'attraction des lymphocytes T. Ces lymphocytes vont à leur tour induire la prolifération des cellules musculaires lisses dans la paroi artérielle et l'accumulation de collagène. Ce processus résulte en la formation de lésions athérosclérotiques riches en lipides. La rupture de cette lésion mène, la plupart du temps, à un infarctus [Boyle 2007]. Le diabète, en aggravant l'inflammation et en ralentissant le flux sanguin, accélère significativement le processus d'athérosclérose.

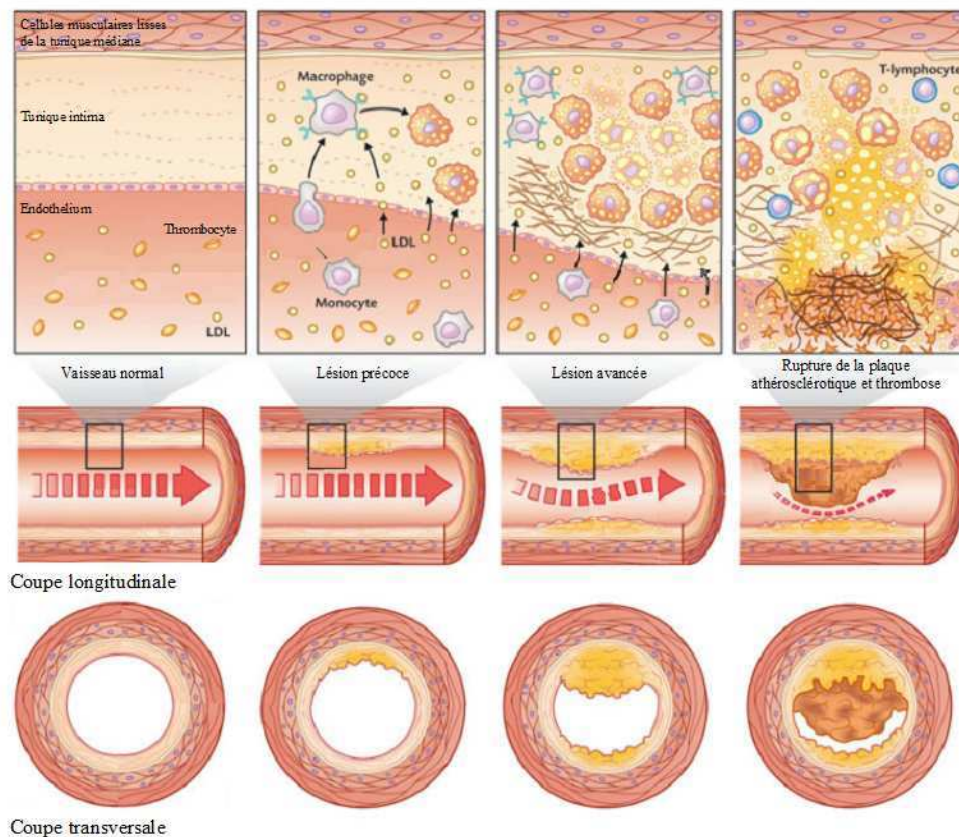


Figure 13 : Evolution de l'athérosclérose au cours du temps (coupes longitudinale et transversale).

En plus de la formation de la plaque d'athérome, le DT2 est également responsable de l'augmentation de l'adhésion des plaquettes et d'une hypercoagulation. La formation d'acide nitrique anormal, l'augmentation de la formation de radicaux libres ainsi que l'altération de la régulation du calcium induit

l'agrégation des plaquettes. Une concentration élevée en PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor type-1) semble également détériorer la fibrinolyse chez les patients diabétiques. L'augmentation de la coagulation ainsi que la détérioration de la fibrinolyse augmentent le risque d'occlusion vasculaire et d'évènements cardiovasculaires dans le DT2 [Beckman *et al.* 2002].

Les complications macrovasculaires dues au DT2 peuvent donc avoir des conséquences très graves et sont à l'origine de maladies cardiovasculaires sévères tels que : (i) un infarctus du myocarde (une personne diabétique a 2 à 4 fois plus de risque d'en être atteinte qu'une personne non diabétique), (ii) une artérite ou artériopathie périphérique pouvant occasionner une gangrène ou (iii) un accident vasculaire cérébral. Les maladies cardiovasculaires représentent la moitié des décès chez les individus diabétiques.

Comme expliqué précédemment, des facteurs environnementaux et des facteurs de prédisposition génétique interviennent dans la survenue du DT2 chez l'homme. Or, une meilleure connaissance des facteurs génétiques peut aider à mieux comprendre la physiopathologie de cette maladie. C'est pourquoi nous avons cherché à caractériser l'un de ces déterminants génétiques.

VI.Principe des études génétiques

1. Polymorphismes

Un polymorphisme est une variation de la séquence nucléotidique d'un gène donné dans une population. Un gène est considéré comme polymorphe s'il existe au moins deux versions différentes, appelées allèles, avec une fréquence $\geq 1\%$. Les polymorphismes génétiques peuvent être des mutations ponctuelles ne touchant qu'un seul nucléotide (appelé SNP (Single Nucleotide Polymorphism)), des délétions ou des insertions de plusieurs nucléotides ou des variations alléliques du nombre de copie d'un motif unique (appelé CNV (Copy Number Variation)). Les SNPs constituent les polymorphismes les plus fréquents du génome humain ; en effet, il existe environ 10 millions de SNPs représentant 90% de la variation génétique humaine [International HapMap Consortium 2003]. Ils sont répartis sur l'ensemble du génome et peuvent être localisés dans les exons, les introns ou les régions intergéniques ; on compte environ un SNP toutes les 300 paires de bases en

moyenne. Ce nombre important explique l'énorme intérêt qu'ils suscitent dans les domaines de la médecine et de la pharmacogénétique où ils sont notamment utilisés pour détecter des prédispositions individuelles à certaines maladies. La majorité des SNPs sont phénotypiquement neutres c'est à dire qu'ils ne modifient pas le phénotype chez celui qui les porte mais il est intéressant de noter que les SNPs localisés dans des régions non codantes peuvent avoir des conséquences importantes sur l'épissage, la fixation de facteurs de transcription ou sur les séquences d'ARN (Acide RiboNucléique) non codant. Bien qu'environ 99,9% de la séquence d'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) soit la même chez tous les humains, la fraction de la séquence qui varie joue un rôle important, car elle détermine les différences entre les individus, notamment en termes de risque de maladie et de réponse aux médicaments.

L'ensemble des SNPs est référencé dans des bases de données publiques, notamment celles du projet « HapMap » (www.hapmap.org) et du NCBI (www.ncbi.org).

2. Déséquilibre de liaison

Le déséquilibre de liaison (DL) correspond à une répartition non aléatoire d'allèles pour un certain nombre de locus. Il traduit donc l'indépendance ou la non-indépendance physique de deux loci lors de leur transmission aux gamètes, au cours de la méiose.

Considérons deux loci bi-alléliques, A et B, d'allèles respectifs (A1 fréquent, A2 rare) et (B1 fréquent, B2 rare). La répartition des deux allèles sur un chromosome peut être (A1,B1), (A1,B2), (A2,B1) ou (A2,B2).

Appelons p_{A1} , p_{A2} , p_{B1} , p_{B2} les fréquences alléliques et p_{A1B1} , la fréquence à laquelle on observe, dans une population, le chromosome porteur des allèles A1 et B1, de même pour p_{A1B2} , p_{A2B1} et p_{A2B2} .

Si l'on suppose que les allèles de chaque locus sont distribués au hasard, les fréquences théoriques des chromosomes doivent être :

- $p_{A1B1} = p_{A1} \times p_{B1}$
- $p_{A1B2} = p_{A1} \times p_{B2}$
- $p_{A2B1} = p_{A2} \times p_{B1}$
- $p_{A2B2} = p_{A2} \times p_{B2}$.

Si les fréquences observées de ces chromosomes ne diffèrent pas significativement de ces fréquences théoriques, les loci sont dits en équilibre de liaison. Cependant, il peut exister une différence entre les fréquences chromosomiques observées et les fréquences à l'équilibre. On définit alors le déséquilibre de liaison D comme la différence entre les fréquences chromosomiques observées et les fréquences théoriques à l'équilibre et on a alors : $D > 0$, lorsque les allèles rares (ou fréquents) des deux loci sont préférentiellement associés ensemble et $D < 0$, lorsque l'allèle rare de l'un des loci est préférentiellement associé à l'allèle fréquent de l'autre locus.

La valeur maximale ou minimale de D peut être calculée à partir des fréquences alléliques des loci A et B . Ainsi, concernant la valeur maximale de D (D_{max}), qui est la plus fréquemment utilisée, désignons par A celui des deux loci pour lequel la fréquence de l'allèle rare est la plus faible ($p_{A2} < p_{B2}$) :

- Si $D > 0$, $D_{max} = p_{A2} (1 - p_{B2}) = p_{A2} p_{B1}$
- Si $D < 0$, $D_{max} = p_{A2} (1 - p_{B1}) = p_{A2} p_{B2}$

Le DL est plus communément exprimé sous la forme de deux coefficients : le coefficient D' de Lewontin (1964) et le coefficient de corrélation entre les allèles, r^2 . Le coefficient D' est égal au rapport D/D_{max} et est compris entre -1 et $+1$. Plus la valeur absolue de ce rapport est proche de 1 , plus le DL est fort ; la valeur absolue 1 correspondant à un déséquilibre complet. Le coefficient r^2 est égal au rapport $(D)^2 / (p_{A1} \times p_{A2} \times p_{B1} \times p_{B2})$. La valeur 1 correspond dans ce cas à un déséquilibre parfait, signifiant non seulement que $D'=1$, mais aussi que les fréquences alléliques des deux loci sont strictement égales. Dans le cas où le coefficient entre 2 SNPs est égal à 1 , la présence d'un allèle implique automatiquement la présence de l'autre, l'information recueillie à partir de l'étude d'un des deux polymorphismes est donc strictement identique à celle qui serait fournie par l'étude du polymorphisme avec lequel il est en DL parfait. Dans la plupart des études (incluant les nôtres), le DL est considéré comme fort si le r^2 est supérieur ou égal à $0,80$.

Le DL diminue au cours des générations successives à cause des recombinaisons génétiques (crossing-over), d'autant plus lentement que les deux loci sont très proches sur le même chromosome : la force du DL exprime, sous certaines conditions, la proximité physique des deux loci.

3. Haplotypes

Les allèles de plusieurs SNPs qui sont proches tendent à rester regroupés lors de la transmission héréditaire : un tel groupe d'allèles de SNPs associés dans une région chromosomique est appelé haplotype.

Les fréquences haplotypiques ne peuvent être, en fait, mesurées que dans le cadre d'études familiales. Cependant, des modèles statistiques de maximum de vraisemblance permettent d'estimer les fréquences haplotypiques dans des populations d'individus non apparentés à partir des fréquences des génotypes, permettant ainsi d'évaluer l'impact d'une combinaison particulière de polymorphismes sur un phénotype donné et non pas d'un seul polymorphisme [Furihata *et al.* 2006] [Tregouet *et al.* 2004].

Quand des polymorphismes présentent un DL, la transmission des allèles d'un chromosome se fait en réalité par bloc haplotypique. La probabilité de recombinaison est donc très faible au sein d'un même bloc. Ces haplotypes sont généralement séparés par des régions de faible DL représentant des points chauds (« hot spots ») de recombinaison méiotique. Chaque bloc haplotypique est donc défini par la combinaison d'un nombre variable de polymorphismes et chaque gène peut contenir un nombre variable de blocs haplotypiques. Cette notion est essentielle en étude d'association car si un bloc haplotypique contient 5 SNPs et que ce bloc est associé à un phénotype donné alors le SNP fonctionnel peut être n'importe lequel de ces 5 SNPs.

4. Tag-SNPs

L'utilisation du DL, et plus particulièrement des blocs haplotypiques, est couramment utilisée en étude d'association afin d'alléger la quantité de SNPs à génotyper. En effet, du fait de la corrélation existant entre les polymorphismes d'un même bloc, il est possible de sélectionner le ou les SNPs les plus informatifs, c'est-à-dire représentant au mieux l'information portée par le bloc haplotypique ; ces SNPs sont appelés tag-SNPs (Figure 14). Les Tag-SNPs permettent ainsi de réduire le nombre de polymorphismes à étudier sans perdre d'information génétique et donc le coût du génotypage.

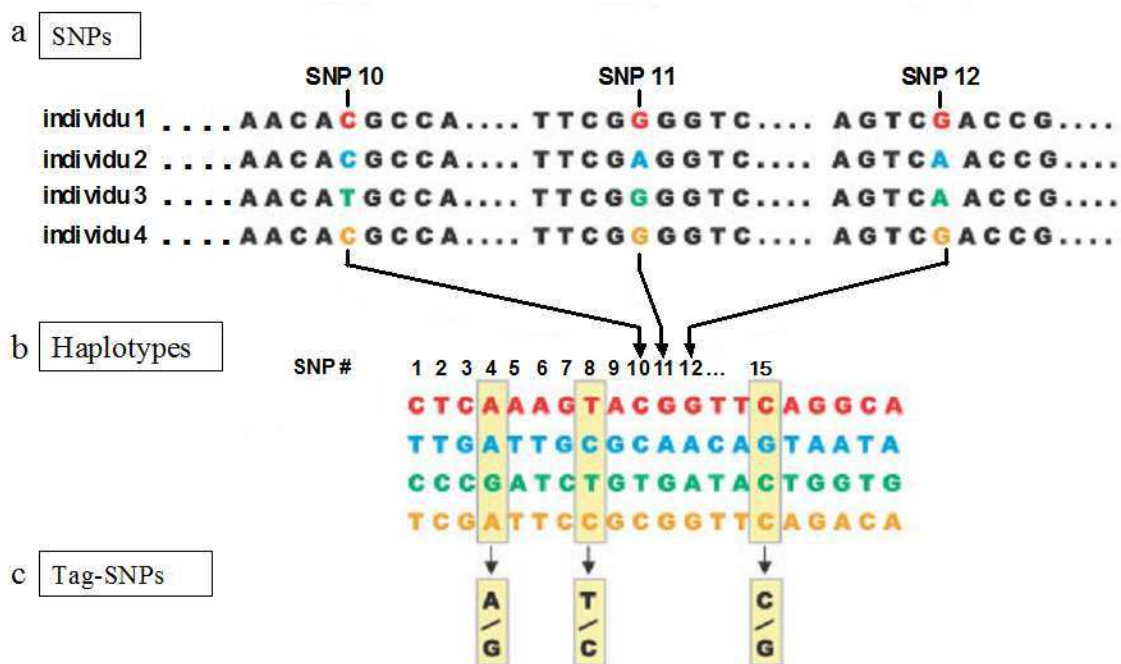


Figure 14 : Principe de la construction de HapMap (d'après le projet HapMap). La construction d'une carte de déséquilibre de liaison se fait en trois étapes. (a) Les polymorphismes nucléotidiques simples (SNPs) sont identifiés dans les échantillons d'ADN provenant de nombreux individus. (b) Les SNPs adjacents qui sont hérités simultanément sont regroupés en haplotypes dont la fréquence dans la population excède un pour cent. (c) Des SNPs marqueurs, au sein d'un haplotype, sont choisis pour constituer un identifiant unique de cet haplotype. En génotypant les trois SNPs marqueurs illustrés dans cette figure (SNPs 4, 8 et 15), il est possible de déterminer lequel des quatre haplotypes illustrés est porté par chaque individu.

Afin de définir au mieux l'ensemble de l'information génétique du génome humain, le projet international « HapMap » a été créé afin de développer une carte d'haplotypes du génome qui décrit les variations fréquentes dans la séquence de l'ADN humain [International HapMap Consortium 2003]. Ce projet est le fruit d'une collaboration entre des scientifiques japonais, britanniques, canadiens, chinois, nigériens et américains et a été lancé officiellement en octobre 2002.

Pour caractériser au mieux les profils de variation génétique et les blocs haplotypiques du génome humain, plusieurs milliers de SNPs ont été génotypés par séquençage de 30 trios (deux parents et un enfant) d'origine Européenne, de 30 trios d'origine Africaine et de 90 individus Asiatiques non apparentés. La fréquence des variations nucléotidiques ainsi que les valeurs de DL ont ensuite été calculées dans les différentes populations. Suite à l'analyse des blocs haplotypiques mis en

évidence, on estime à 300 000 le nombre de tag-SNPs nécessaire pour couvrir les régions génomiques présentant un DL fort ($r^2 > 0,8$), et à 500 000 le nombre de SNPs supplémentaires pour couvrir les régions de plus faible DL [Wang *et al.* 2005]. Une couverture optimale du génome entier nécessiterait donc au moins 800 000 SNPs.

Cet outil permet l'approche d'association indirecte applicable aux gènes candidats, à toutes les régions identifiées par les analyses de liaisons familiales ou à la recherche de facteurs de risque de maladies par analyse du génome entier.

5. Analyses statistiques

a. Equilibre d'Hardy Weinberg

Lorsque l'on réalise une étude d'association génétique, il est nécessaire de vérifier que chaque SNP est en équilibre d'Hardy Weinberg dans la population étudiée. Ce principe a été indépendamment décrit par le physicien Wilhelm Weinberg (1862-1937) et le mathématicien Godfrey Hardy (1877-1947). Une population est dite en équilibre d'Hardy Weinberg si elle est de taille infinie, c'est-à-dire suffisamment grande pour être gouvernée par les lois de Mendel, si l'espèce est diploïde et dispose d'une reproduction sexuée, si les mariages se font au hasard (panmixie), s'il n'y a ni migration, ni mutation, ni sélection naturelle et que les générations ne se chevauchent pas. Dans ce cas, la fréquence des allèles et des génotypes reste stable au cours des générations et on peut calculer les fréquences génotypiques directement à partir des fréquences alléliques et inversement. Si A et a sont les allèles d'un locus autosomique bi-allélique de fréquence respective p et q, alors $p + q = 1$ puisqu'il n'y a que 2 allèles. Si dans cette population, les unions entre les individus se font bien au hasard, il va y avoir un mélange aléatoire de gamètes porteurs de l'allèle A ou de l'allèle a, conduisant à 3 génotypes possibles : AA, Aa ou aa. On a alors la fréquence dans la population des génotypes AA = p^2 , la fréquence dans la population des génotypes aa = q^2 et la fréquence des génotypes Aa et aA = $2pq$, ce qui nous donne $p^2 + 2pq + q^2 = 1$. Le génotype des descendants dépend du type d'union mais la fréquence des génotypes AA, Aa ou aa ne change pas d'une génération à l'autre. Si la distribution génotypique respecte statistiquement cette loi alors la population est dite en équilibre d'Hardy-Weinberg pour le SNP considéré.

Pour vérifier cela, la structure des fréquences génotypiques obtenues à partir des données observées est comparée aux fréquences calculées selon la loi de Hardy-Weinberg, grâce à un test du χ^2 à un degré de liberté (ddl). Si cette différence est significative alors le SNP n'est pas en équilibre d'Hardy-Weinberg dans la population.

b. Analyses statistiques utilisées dans les études d'association

Les études d'association permettent, de façon très efficace, de mettre en évidence des effets restreints sur le risque de développer une maladie ou des interactions entre les facteurs étudiés (génétiques ou environnementaux).

Elles consistent à évaluer des associations statistiques entre les génotypes des individus et un phénotype donné en comparant les fréquences des génotypes entre un échantillon de sujets présentant le phénotype étudié (par exemple, une maladie) et un échantillon de sujets ne présentant pas le phénotype. Ces analyses se formalisent sous la forme d'un tableau de contingence 2x3. Un test du χ^2 permet de tester la différence entre les effectifs génotypiques observés entre les deux groupes et ceux attendus sous l'hypothèse d'une indépendance entre la maladie et le polymorphisme étudié. La sur ou sous-représentation statistiquement significative d'un génotype particulier dans l'un des deux groupes comparés suggère l'association de cet allèle avec la maladie. La force de l'association est alors estimée par le calcul de l'odds ratio (OR) défini comme le rapport entre la proportion de sujets porteurs de l'allèle à risque chez les cas et la proportion de sujets porteurs de l'allèle à risque chez les témoins. Les calculs d'OR sont réalisés par des modèles de régression logistique ajustés sur les facteurs de risque conventionnels. Cet OR illustre l'augmentation (OR>1) ou la diminution (OR<1) du risque de survenue de la maladie chez les sujets porteurs de l'allèle à risque par rapport aux sujets non porteurs.

Les études d'association consistent également en la comparaison de la moyenne d'un phénotype (par exemple, le dosage d'une constante biologique telle que la glycémie ou d'un paramètre anthropométrique tel que le poids) entre les individus présentant les différents génotypes. L'approche statistique la plus fréquente est celle d'une analyse de variance (ANOVA (ANalysis Of VAriance)) comparant les moyennes du phénotype étudié entre groupes de génotypes ou d'une analyse de covariance (ANCOVA) si l'analyse est ajustée sur les facteurs de confusion.

En théorie, les tests réalisés sont considérés comme statistiquement significatifs lorsque la valeur de la probabilité (p) calculée est $\leq 0,05$. Cette valeur correspond à un risque α , ou risque de première espèce, de 5% qui représente la probabilité de conclure à tort à une association. Il existe également un risque β , ou risque de deuxième espèce, qui représente la probabilité d'exclure à tort une association. C'est la gestion de ces deux types de risque qui détermine la puissance statistique d'une étude.

Aujourd'hui, avec la multiplication des études d'association comportant un très grand nombre de SNPs, une correction pour tests multiples est primordiale. En effet, le fait d'augmenter le nombre de SNPs étudiés augmente le nombre de tests effectués et ainsi la probabilité de mettre en évidence un résultat significatif par hasard. Concrètement, si on effectue 100 tests indépendants avec un seuil de significativité à 0,05, statistiquement 5 tests apparaîtront comme significatifs par le seul fait du hasard (faux positifs). Une correction pour tests multiples consiste alors à corriger le seuil de significativité pour considérer l'association comme significative. La correction pour test multiple la plus souvent utilisée est celle de Bonferroni ; elle consiste à diviser le seuil de significativité généralement admis à 0,05 par le nombre de tests effectués [Bland *et al.* 1995]. Cependant, cette correction est connue pour être trop stricte et souvent inadaptée aux études de polymorphismes génétiques [Rice *et al.* 2008] (une correction trop stricte peut en effet entraîner le risque de rejeter une association alors qu'elle est réelle).

c. Facteurs de confusion et interactions

Dans une étude d'association, la relation statistique observée entre un polymorphisme et un phénotype peut être, en tout ou partie, expliquée par un facteur de confusion (consommation de tabac, IMC...). Un facteur de confusion est un facteur de risque connu de la maladie et présente une association avec le facteur de risque examiné (le polymorphisme) ou la maladie. Le facteur de confusion peut influencer également le résultat : il peut alors affaiblir ou renforcer une association entre la maladie et les résultats observés. Du fait de cette confusion, un lien inexistant dans la réalité peut être suggéré ou, au contraire, un lien réel peut être méconnu.

Les analyses stratifiées constituent une méthode permettant de contrôler la confusion, en évaluant l'association entre le facteur d'exposition et la maladie dans

les catégories ou classes de la variable potentiellement confondante. Malheureusement, en posant rapidement le problème de la puissance statistique, l'analyse stratifiée n'est pas une méthode pratique pour contrôler simultanément plusieurs facteurs confondants. Une solution alternative consiste à recourir à l'analyse multivariée.

L'interaction, ou modification d'effet, qui se distingue de la confusion, constitue une information très intéressante. Certains facteurs de risque génétiques peuvent n'avoir d'effets que dans des contextes physiologiques (âge, sexe...), environnementaux (consommation de tabac, consommation d'alcool...) ou pathologiques (hypertension artérielle, dyslipidémies...) qu'il est intéressant de caractériser par des recherches d'interactions statistiques. Ces analyses d'interactions permettent, ainsi, d'identifier des sous-groupes à plus haut risque, avec des implications potentielles en terme de santé publique. Le terme d'interaction est souvent source d'ambiguïté, l'interaction statistique se différenciant de l'interaction biologique ou causale [Clayton *et al.* 2001]. En terme statistique, il existe une interaction gène-environnement (ou gène-gène) lorsque l'effet du polymorphisme sur la maladie dépend de l'exposition à un facteur environnemental (ou de la présence d'un autre polymorphisme génétique). Autrement dit, le taux d'incidence de la pathologie en présence des deux facteurs (gène/environnement ou gène/gène) diffère du taux d'incidence attendu résultant de leur effet individuel. Lorsque l'effet est supérieur à celui attendu, on parle d'interaction positive ou synergique et lorsqu'il plus faible on parle d'interaction négative ou antagoniste. Ce concept statistique de l'interaction a été critiqué parce qu'il est arbitraire, modèle-dépendant, et ne tient pas compte de la notion d'interaction biologique [Greenland 1993]. L'interaction au sens biologique suppose la participation coordonnée de deux facteurs de risque dans un mécanisme étiologique commun, responsable du développement de la maladie [Rothman *et al.* 1980]. En épidémiologie génétique, l'interprétation de l'existence d'une interaction s'appuie, le plus souvent, sur des considérations statistiques mais la validité du modèle doit idéalement reposer sur des connaissances biologiques [Clayton *et al.* 2001]. Ceci est d'autant plus complexe que le même modèle statistique traduisant un risque de maladie peut refléter simultanément plusieurs mécanismes biologiques plus ou moins distincts. Enfin, l'une des limites à la recherche d'interaction réside à nouveau dans la puissance statistique nécessaire pour les détecter.

VII. Gènes de susceptibilité au diabète de type 2

1. Etudes d'analyse de liaison et études d'associations gène-candidat

Les premières méthodes utilisées pour identifier des gènes de susceptibilité pour des maladies ou des traits phénotypiques étaient les analyses de liaison et les études gène-candidat.

L'analyse de liaison consiste à étudier la co-ségrégation de 2 ou plusieurs loci (marqueurs, gènes ou caractères) dans une famille pour estimer les taux de recombinaison entre ces loci et tester leur liaison génétique [Rebai 2000]. Ces études ont permis d'identifier des variants génétiques familiaux et de découvrir de nombreuses mutations causales pour les formes monogéniques de diabètes tels que le diabète de type MODY. Le premier gène de susceptibilité au DT2 découvert par cette méthode en 2000, dans une population mexicaine-américaine, fut *CAPN10* (Calpain-10) [Horikawa *et al.* 2000] mais cette association n'a jamais été répliquée. Reynisdottir *et al.* ont montré en 2003, également grâce à cette méthode, que des SNPs du gène *TCF7L2* (Transcription factor 7-like 2) étaient associés au DT2 ainsi qu'à une diminution de la sécrétion d'insuline [Reynisdottir *et al.* 2003].

Les études d'associations gène-candidat consistent à rechercher et analyser les variants génétiques de gènes dont la fonction est connue et qui pourraient jouer un rôle dans la pathologie en question. Ce type d'étude a permis de montrer que les variants des gènes *PPARG* (P12A) (Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma) et *KCNJ11* (E23K) (Potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 11) sont deux gènes de susceptibilité au DT2 [Altshuler *et al.* 2000] [Gloyn *et al.* 2003].

Néanmoins, les méthodes d'analyse de liaison et d'association gène-candidat sont limitées. En effet, les analyses de liaison sont restreintes aux analyses familiales, ce qui limite l'étude aux maladies monogéniques Mendéliennes. Le manque de succès des études d'analyses de liaison peut également s'expliquer par un manque de puissance de ces études. Quant aux études gène-candidat, elles présentent le défaut de ne pouvoir cibler et analyser que les gènes dont la fonction est évidemment connue et qui présentent un rapport *a priori* évident avec la pathologie.

2. Etudes d'association génome entier ou "Genome Wide Association Studies"

a. Qu'est-ce qu'une étude GWA ?

Au début des années 1990, deux projets internationaux ont fait leur apparition : le projet « génome humain » et le projet international « HapMap ». La mission du projet « génome humain » était d'établir le séquençage complet de l'ADN du génome humain [Venter *et al.* 2001].

Ces deux projets ont rendu possible la mise en place d'une nouvelle méthode d'étude d'association : les études pangénomiques ou GWA (Genome-Wide Association). Ce sont des études d'associations réalisées sur plusieurs milliers de SNPs, sélectionnés sans *a priori* et répartis sur l'ensemble du génome, et sur un trait phénotypique ou une maladie (Figure 15) [Billings *et al.* 2010].

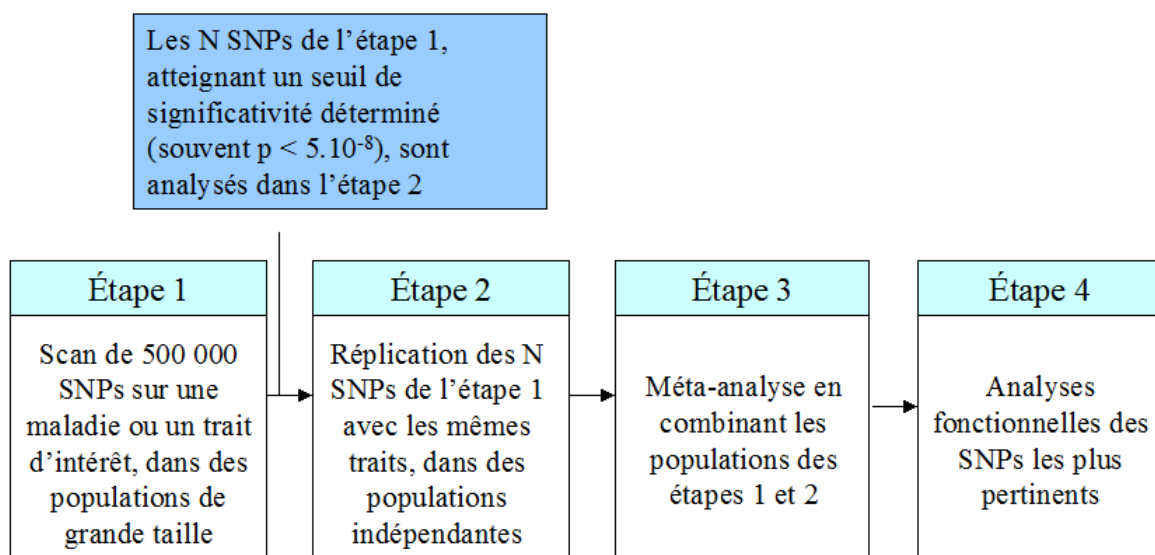


Figure 15 : Principe d'une GWAS.

La découverte qu'un SNP particulier est présent à une fréquence plus importante chez les personnes malades que chez les personnes témoins suggère que ce SNP est associé à cette maladie. Afin de réduire le nombre de résultats faux-positifs, il est nécessaire d'appliquer une correction pour tests multiples, au vu du très grand nombre de SNPs testés ; la plus couramment utilisée est la correction de Bonferroni. Pour les GWAS, le seuil de significativité accepté, à l'heure actuelle, est de $p=5.10^{-8}$. La réalisation d'une étude GWA se fait en plusieurs étapes (Figure 15). La première

consiste en un scan de l'ensemble du génome, à l'aide de puces à ADN d'environ 500 000 SNPs, réalisé dans une ou plusieurs grandes cohortes. L'étape 2 est une étape de réplification des meilleurs SNPs (top SNPs) dans des échantillons indépendants, en se basant sur un certain seuil de significativité (dépendant du nombre de SNPs étudié), sur l'association connue entre le variant et la maladie et sur la plausibilité de l'association [Billings *et al.* 2010]. Les SNPs répliqués avec succès sont ensuite méta-analysés dans les cohortes combinées des étapes 1 et 2. Pour finir, des analyses fonctionnelles peuvent être réalisées sur les SNPs les plus pertinents.

b. Etudes GWA sur le diabète de type 2

La première étude GWA sur le DT2 a été conduite dans une cohorte française composée de 661 cas et de 614 témoins sur 392 935 SNPs. Après réplification dans un échantillon de 2617 cas et 2894 témoins, elle a permis d'identifier de nouveaux facteurs de susceptibilité associés au DT2 tels que *SLC30A8*, *HHEX*, *LOC387761* et *EXT2* et de valider l'association avec *TCF7L2* [Sladek *et al.* 2007], précédemment identifié en analyse de liaison.

Trois groupes de collaborateurs, le consortium Wellcome Trust Case Control Consortium/United Kingdom Type 2 Diabetes Genetics (WTCCC/UKT2D), le consortium Finland-United States Investigation of NIDDM (FUSION) et le consortium Diabetes Genetics Initiative (DGI) ont répliqué les associations de *SLC30A8* et de *HHEX* avec le DT2 et ont découvert de nouvelles associations avec *CKAL1*, *IGF2BP2* et *CDKN2A/B* [Saxena *et al.* 2007] [Zeggini *et al.* 2007] [Scott *et al.* 2007]. Suite à ces résultats, les 3 consortiums ont décidé de fusionner afin d'augmenter la taille de leurs échantillons et ainsi augmenter leur puissance statistique. Ils ont ainsi formé le consortium DIAGRAM (Diabetes Genetics Replication and Meta-analysis). Cinq nouveaux loci ont ensuite pu être découverts : *JAZF1*, *CDC123/CAMK1D*, *TSPAN/LGR5*, *THADA* et *ADAMSTS9* [Zeggini *et al.* 2007] (Tableau 2).

c. Etudes GWA sur les traits quantitatifs glycémiques

Des études GWA étudiant les traits quantitatifs liés au diabète (essentiellement glycémie et insulinémie) ont également permis d'identifier de nouveaux loci influençant la fonction de la cellule β -pancréatique et la résistance à l'insuline. En effet, les gènes *G6PC2* et *MTNR1B* ont été retrouvés associés à la glycémie à jeun [Bouatia-Naji *et al.* 2008] [Prokopenko *et al.* 2009] [Bouatia-Naji *et al.* 2009]. Le consortium MAGIC (Meta-Analysis of Glucose and Insulin-related traits Consortium) a réalisé une méta-analyse de 21 GWAS pour identifier des loci associés avec la glycémie à jeun, de l'insulinémie à jeun, les indices HOMA-B et HOMA-IR [Dupuis *et al.* 2010]. Neuf nouveaux loci dans ou près de *ADCY5*, *MADD*, *ADRA2A*, *CRY2*, *FADS1*, *GLIS3*, *SLC2A2*, *PROX1* et *C2CD4B* ont été retrouvés associés avec la glycémie à jeun. Dans cette étude, *PROX1* a été associé au glucose et au HOMA-B. De plus, *GCKR* et un SNP près de *IGF1* ont été associés à l'insulinémie à jeun et au HOMA-IR. Les auteurs de cette étude ont également confirmé l'association des SNPs dans ou près de *DGKB-TMEM195*, *GCGKR*, *G6PC2*, *MTNR1B* et *GCK*. Parmi ces nouveaux loci, *MTNR1B*, *GCK*, *ADCY5*, *DGKB-TMEM195*, *GCGKR* et *PROX1* ont également été associés au DT2.

La plupart des variants génétiques associés au DT2 influencent d'avantage la sécrétion d'insuline que la résistance à l'insuline ; par exemple, les variants des gènes *CDKAL1*, *SLC30A8* et *HHEX* sont associés à une réponse insulinaire défailante dans des tests de tolérance au glucose. Dans le consortium MAGIC, tous les loci associés avec le DT2 (*MTNR1B*, *GCK*, *GCGKR*, *DGKB-TMEM195*, *ADCY5* et *PROX1*) sont également associés avec le glucose à jeun ou le HOMA-B. Seul *GCGKR* a été associé avec le HOMA-IR. Une autre méta-analyse du consortium DIAGRAM+ a montré que parmi les 31 loci de susceptibilité au DT2, 10 étaient nominalelement associés à une diminution du HOMA-B et seuls 3 étaient associés au HOMA-IR [Voight *et al.* 2010], suggérant que le défaut principal des gènes ainsi identifiés soit la sécrétion d'insuline et non l'insulino-résistance.

Depuis la 1^{ère} étude GWA réalisée sur le DT2 en 2007 [Sladek *et al.* 2007], 36 loci ont été découverts comme étant associés au DT2 et 18 loci associés aux traits glycémiques (insuline, glucose, HOMA-IR, HOMA-B ou HGPO (à 2h)). Ces études ont également permis de confirmer l'association de 3 loci avec le DT2 (*PPARG*, *KCNJ11/ABCC8* et *TCF7L2*) [Billings *et al.* 2010] (Tableau 2).

Cependant, selon une étude européenne sur les jumeaux, seuls 10% des gènes de susceptibilité au DT2 sont aujourd'hui connus [Voight *et al.* 2010].

Tableau 2 : Loci associés au DT2 ou aux traits glycémiques dans les GWAS.

Locus	SNP	Chr	Type de mutation	Allèle (à risque/autre)	Fréquence de l'allèle à risque (HapMap-CEU)	Trait	OR ou Beta (95% IC/SE)
2000							
<i>PPARG</i>	rs18012824	3	Mutation faux-sens : Pro12Ala	C/G	0,92	DT2	1,14 (1,08-1,20)
2003							
<i>KCNJ11/ABCC8</i>	rs5219/ rs757110	11	Mutation faux-sens : Glu23Lys/Ala1369Ser	T/C G/T	0,5 0,4	DT2	1,15 (1,09-1,21)
2006							
<i>TCF7L2</i>	rs7903146	10	intronique	T/C	0,25	DT2	1,37 (1,28-1,47)
						glucose	0,023 (0,004)
	rs12243326		intronique	C/T	0,21	HGPO (2h)	0,07 (0,01)
2007							
<i>IGF2BP2</i>	rs4402960	3	intronique	T/G	0,29	DT2	1,17 (1,10-1,25)
<i>CDKAL1</i>	rs7754840	6	intronique	C/G	0,31	DT2	1,12 (1,08-1,16)
<i>SLC30A8</i>	rs13266634	8	Mutation faux-sens : Arg325Trp	C/T	0,75	DT2	1,12 (1,07-1,16)
						glucose	0,027 (0,004)
<i>CDKN2A/B</i>	rs10811661	9	125 kb en amont	T/C	0,79	DT2	1,20 (1,14-1,25)
<i>HHEX</i>	rs111187513	10	7,7 kb en aval	C/T	0,56	DT2	1,13 (1,08-1,17)
<i>FTO</i>	rs8050136	16	intronique	A/C	0,45	DT2	1,15 (1,09-1,22)
<i>HNF1B</i>	rs757210	17	intronique	A/G	0,43	DT2	1,12 (1,07-1,18)
2008							
<i>NOTCH2</i>	rs1092393118	1	intronique	T/G	0,11	DT2	1,13 (1,08-1,17)
<i>THADA</i>	rs757859718	2	Mutation faux-sens : Thr1187Ala	T/C	0,92	DT2	1,15 (1,10-1,20)
<i>ADAMSTS9</i>	rs460710318	3	38 kb en amont	C/T	0,81	DT2	1,09 (1,06-1,12)
<i>JAZF1</i>	rs86474518	7	intronique	T/C	0,52	DT2	1,10 (1,07-1,13)
<i>CDC123/CAMK1D</i>	rs1277979018	10	Intergenic region	G/A	0,23	DT2	1,11 (1,07-1,14)
<i>KCNQ1</i>	rs2237892	11	intronique	C/T	0,61	DT2	1,4 (1,34-1,47)
	rs231362		intronique	G/A	0,52	DT2	1,08 (1,06-1,10)
<i>TSPAN8/LGR5</i>	rs796158118	12	intronique	C/T	0,23	DT2	1,09 (1,06-1,12)
2009							
<i>IRS1</i>	rs294364127	2	502 kb en amont	C/T	0,61	DT2	1,19 (1,13-1,25)
2010							
<i>DUSP9</i>	rs594532665	X	8 kb en amont	G/A	0,12	DT2	1,27 (1,18-1,37)
<i>PROX1</i>	rs34087435	1	2 kb en amont	C/T	0,5	glucose	0,013 (0,003)
						DT2	1,07 (1,05-1,09)
<i>BCL11A</i>	rs24302165	2	99 kb en aval	A/G	0,46	DT2	1,08 (1,06-1,10)
<i>G6PC2</i>	rs56088735	2	intronique	C/T	0,7	glucose	0,075 (0,004)
						HOMA-B	-0,042 (0,004)
						HbA1C	0,032 (0,004)

Locus	SNP	Chr	Type de mutation	Allèle (à risque/autre)	Fréquence de l'allèle à risque (HapMap-CEU)	Trait	OR ou Beta (95% IC/SE)
<i>GCKR</i>	rs1260326	2	Mutation faux-sens : Leu446Pro intronique	T/C	0,4	HGPO (2h)	0,10 (0,01)
	rs780094			C/T	0,62	glucose	0,029 (0,003)
						insuline	0,032 (0,004)
						HOMA-IR	0,035 (0,004)
						DT2	1,06 (1,04-1,08)
<i>ADCY5</i>	rs2877716	3	intronique	C/T	0,77	HGPO (2h)	0,07 (0,01)
	rs11708067		intronique	A/G	0,78	glucose	0,027 (0,003)
						HOMA-B	-0,023 (0,004)
						DT2	1,12 (1,09-1,15)
<i>SLC2A2</i>	rs1192009035	3	intronique	T/A	0,85	glucose	0,02 (0,004)
<i>WFS1</i>	rs180121465	4	jonction intron-exon	G/A	0,27	DT2	1,13 (1,07-1,18)
<i>ZBED3</i>	rs445705365	5	41 kb en amont	G/A	0,26	DT2	1,08 (1,06-1,11)
<i>DGKB/TMEM195</i>	rs219134935	7	région intergénique	T/G	0,47	glucose	0,03 (0,003)
						DT2	1,06 (1,04-1,08)
<i>GCK</i>	rs460751735	7	36 kb en amont	A/G	0,2	glucose	0,062 (0,004)
						HbA1C	0,041 (0,005)
						DT2	1,07 (1,05-1,10)
<i>KLF14</i>	rs97228365	7	47 kb en amont	G/A	0,55	DT2	1,07 (1,05-1,10)
<i>TP53INP1</i>	rs89685465	8	intronique	T/C	0,48	DT2	1,06 (1,04-1,09)
<i>GLIS3</i>	rs703420035	9	intronique	A/C	0,53	glucose	0,018 (0,003)
						HOMA-B	-0,020 (0,004)
<i>TLE4 g</i>	rs1329213665	9	234 kb en amont	C/T	0,93	DT2	1,11 (1,07-1,15)
<i>ADRA2A</i>	rs1088512235	10	210 kb en aval	G/T	0,9	glucose	0,022 (0,004)
<i>CENTD2</i>	rs155222465	11	5' UTR	A/C	0,88	DT2	1,14 (1,11-1,17)
<i>CRY2</i>	rs1160592435	11	intronique	A/C	0,54	glucose	0,015 (0,003)
<i>FADS1</i>	rs17455035	11	intronique	T/C	0,63	glucose	0,017 (0,003)
						HOMA-B	-0,020 (0,003)
<i>MADD</i>	rs794458435	11	intronique	A/T	0,69	glucose	0,021 (0,003)
<i>MTNR1B</i>	rs1083096335	11	intronique	G/C	0,3	glucose	0,067 (0,003)
						HOMA-B	-0,034 (0,004)
						HbA1C	0,024 (0,004)
						DT2	1,09 (1,06-1,12)
<i>HMGA2</i>	rs153134365	12	43 kb en amont	C/G	0,1	DT2	1,10 (1,07-1,14)
<i>HNF1A</i>	rs795719765	12	20 kb en aval	T/A	0,85	DT2	1,07 (1,05-1,10)
<i>IGF1</i>	rs3576735	12	1,2 kb en amont	G/A	0,9	insuline	0,01 (0,006)
						HOMA-IR	0,013 (0,006)
<i>C2CD4B</i>	rs1107165735	15	21 kb en aval	A/G	0,59	glucose	0,008 (0,003)
<i>PRC1</i>	rs804268065	15	intronique	A/C	0,22	DT2	1,07 (1,05-1,09)
<i>VPS13C</i>	rs1727130536	15	intronique	G/A	0,42	HGPO (2h)	0,07 (0,01)
<i>ZFAND6</i>	rs1163439765	15	1,5 kb en aval	G/A	0,56	DT2	1,06 (1,04-1,08)
<i>GIPR</i>	rs1042392836	19	intronique	A/T	0,18	HGPO (2h)	0,11 (0,01)

DT2 = Diabète de Type 2; glucose = glucose à jeun (mmol/L); insuline = insuline à jeun (pmol/L); HGPO (2h) = HyperGlycémie Provoquée par voie Orale à 2h (ajustée sur le glucose à jeun); HbA1C = Hémoglobine A1C (%); HOMA-IR = HOmeostasie Model Assesment-Insulin Resistance; HOMA-B = HOmeostasie Model Assesment-B-cell function; OR= Odds Ratio; IC = Intervalle de Confiance (d'après Billings et al. 2010).

d. Limites et perspectives des GWAS

i. Limites des GWAS

Les GWAS réalisées sur le DT2 ont permis de découvrir des gènes de susceptibilité à cette maladie qu'il n'était pas possible de découvrir par les méthodes d'analyse de liaison ou gène-candidat. Cependant, ces études comportent quelques limites et ne permettent pas, à l'heure actuelle, d'expliquer la totalité de l'héritabilité du DT2.

En effet, il existe un nombre important de SNPs non capturés dans les bases de données publiques [Imamura *et al.* 2011]. De plus, comme le seuil de significativité exigé est très bas, cela peut être la cause de résultats faux-négatifs ; ceci pourrait être corrigé grâce à des analyses à plus grande échelle [Imamura *et al.* 2011]. Par ailleurs, les études GWA utilisent des TagSNPs qui sont représentatifs d'un ensemble de SNPs et définis par les blocs de DL ; ce ne sont pas forcément les variants génétiques causaux (SNPs fonctionnels). Il est donc nécessaire de chercher à identifier ces SNPs fonctionnels.

La majorité des gènes associés au DT2 identifiés dans les GWAS codent pour des protéines impliquées dans la fonction des cellules bêta incluant la sensibilité au glucose, la synthèse de la proinsuline et la sécrétion d'insuline. Dans ces mêmes études, peu de gènes associés au DT2 sont impliqués dans la résistance à l'insuline. Ceci peut s'expliquer par :

- (i) le design des études : dans l'une des études, les individus ont un IMC < 30 kg/m², excluant ainsi les personnes obèses [Sladek *et al.* 2007], et dans une autre, les témoins et les cas sont appariés sur l'IMC, biaisant ainsi la découverte de variants susceptibles d'augmenter le risque de diabète via leur effet sur l'accumulation de la graisse [Saxena *et al.* 2007],

- (ii) une plus faible héritabilité des traits de la résistance à l'insuline ; les indices insulino-géniques sont environ 10% plus héréditaires que le HOMA-IR [Saxena *et al.* 2007] [Florez 2008] indiquant que les gènes impliqués dans la résistance à l'insuline subissent une influence plus forte des facteurs environnementaux tels que l'alimentation ou l'activité physique,

- (iii) un nombre restreint de variants affectant la résistance à l'insuline,

- (iv) une faible fréquence dans la population des variants affectant la résistance à l'insuline (variants rares donc plus difficiles à détecter),

- (v) une faible corrélation des mesures de la sensibilité à l'insuline, dans des études humaines à large échelle, avec la résistance à l'insuline au niveau tissulaire ou moléculaire,

- (vi) les variants affectant la résistance à l'insuline ont un effet plus modeste (donc plus difficile à distinguer du bruit de fond),

- (vii) le diagnostic de DT2 nécessite un certain degré de dégradation des cellules bêta, il n'est donc pas surprenant que cette approche permette d'identifier plus facilement des gènes associés aux fonctions de la cellule bêta que des gènes associés à la résistance à l'insuline [Florez 2008] [Barker *et al.* 2012].

Il existe également des difficultés qui sont intrinsèques à toute étude cas-témoins. Tout d'abord, par définition, les sujets « témoins » ne présentent pas de diabète. Cependant, il se peut fortement que parmi ces sujets, il y en ait qui développeront un diabète plus tard ou qui présentent un début de résistance à l'insuline (mais pas encore de diabète), ce qui diminue la puissance des études cherchant à découvrir des gènes impliqués dans la résistance à l'insuline [Petrie *et al.* 2011].

Par ailleurs, il a été montré que certains variants, impliqués dans le DT2, se sont avérés à risque uniquement quand ils sont transmis par un parent donné [Kong *et al.* 2009]. En effet, des variants à risque du DT2 devenaient « protecteurs » s'ils étaient transmis par l'autre parent. Ces variants sont délicats à mettre en évidence et leur contribution à l'héritabilité est forcément sous estimée si les modèles ne prennent pas en compte l'origine parentale. Un autre exemple concerne des variants génétiques qui augmentent la recombinaison génétique chez les pères et la réduisent chez les mères [Kong *et al.* 2009]. Comme le taux de recombinaison parental affecte la transmission et que la recombinaison peut s'accompagner de mutations, il est possible qu'il y ait une association qui repose aussi sur la nature du parent transmetteur. Dans le même registre, les mécanismes d'empreinte parentale (épigénétique) ne sont pas pris en compte dans les approches GWAS et représentent aussi une part non négligeable du manque d'héritabilité.

ii. Perspectives des GWAS

Différentes approches cherchant à pallier aux problèmes liés aux GWAS existent afin d'identifier de nouveaux gènes de susceptibilité aux maladies complexes.

Tout d'abord, les GWAS prennent en compte les SNPs mais pas les autres variants génétiques dits de « grande taille » (comparés aux SNPs) comme les délétions, les duplications (CNVs), les inversions qui sont communes dans les populations humaines et non accessibles par les approches classiques de génétique (GWAS, séquençage) [Eichler *et al.* 2010]. Ces variants représentent une part non négligeable de la variabilité génétique, les prendre en compte dans les analyses génétiques permettrait de couvrir au maximum l'ensemble de cette variabilité.

Afin d'approfondir les études pangénomiques, des méthodes d'analyse des exons ont été développées. Les exons ne représentent qu'une faible partie du génome mais concentrent 85% des mutations potentiellement responsables des maladies [Choi *et al.* 2009]. Grâce à l'utilisation de nouvelles générations de séquenceurs, il est maintenant possible de réaliser un séquençage à haut-débit des exons de l'ensemble du génome (appelé exome) [Imamura *et al.* 2011]. Cette méthode, appelée "Whole Exome Sequencing" (WES) permet de "capturer" l'ensemble des exons et d'en déterminer la séquence [Choi *et al.* 2009]. Elle permet d'identifier en théorie la quasi totalité des variations de séquences qui existent au niveau des exons entre des sujets malades et non malades. Elle est adaptée à la caractérisation des variants rares qui ne sont pas capturés par les GWAS. Or, l'étude de la variabilité génétique des variants rares permettrait peut-être d'avoir suffisamment de puissance statistique pour détecter les variants associés à la résistance à l'insuline [Billings *et al.* 2010].

Des approches prenant en compte les interactions entre les gènes et entre les gènes et l'environnement peuvent également permettre de mieux comprendre le développement du DT2. En effet, il est connu que les traits quantitatifs (insuline, glucose) peuvent être influencés par des interactions complexes entre gènes [Flint *et al.* 2009]. Une étude réalisée par Cauchi *et al.*, a montré que les gènes exprimés dans le pancréas interagissaient ensemble et que l'effet combiné des SNPs de ces gènes augmentait considérablement le risque de DT2 [Cauchi *et al.* 2008]. En effet, dans cette étude, les auteurs ont découvert que *IGFBP2* et *CXCR4* interagissaient de façon synergique avec *LOC38776*, *SLC30A8*, *HEXX* et *NGN3*, *CDKN2A/2B*, respectivement [Cauchi *et al.* 2008].

Des études récentes portant sur les interactions gène-environnement ont également permis de montrer que les effets de plusieurs loci sur le risque de développer un DT2, tels que *PPARG*, *TCF7L2* et *FTO* peuvent être atténués chez les individus pratiquant une activité physique intense, alors qu'une activité physique moindre et un mode d'alimentation riche en graisse augmentent l'effet de ces gènes sur le risque de développer un DT2 [Venter *et al.* 2001] [Fisher *et al.* 2009] [Haupt *et al.* 2008].

Cependant, une étude réalisée par Aschard *et al.* en 2012 montre que les interactions gène-gène et gène-environnement semblent avoir un effet relativement modeste sur la précision de la discrimination [Aschard *et al.* 2012]. L'identification de ces interactions pourrait cependant amener des indices concernant les mécanismes biologiques des maladies complexes et ainsi permettre d'améliorer la précision des modèles à risque ainsi que la prévention de ces maladies [Aschard *et al.* 2012].

VIII. Choix d'un gène de susceptibilité au diabète de type 2 : PROX1

1. Description du gène *PROX1*

Les analyses GWAS ont permis d'identifier *PROX1* (*PROspero HomeoboX 1*) comme un gène de susceptibilité au DT2. En effet, il est associé au DT2 (OR=1,07, $p=7,2 \cdot 10^{-10}$) et à la glycémie à jeun ainsi qu'au HOMA-B ($p=6,6 \cdot 10^{-6}$ et $p=0,02$, respectivement) [Dupuis *et al.* 2010]. A ce jour, rien n'est connu concernant le rôle de *PROX1* dans la régulation de l'homéostasie glucidique ; c'est pourquoi nous nous sommes particulièrement intéressés à ce gène.

PROX1 est un gène à homéoboîte, d'environ 58 kpb, composé de 5 exons et de 4 introns situé sur le chromosome 1q32.2-q32.3 chez l'Homme et est hautement conservé chez les vertébrés [Elsir *et al.* 2012]. Il a été cloné pour la première fois par homologie avec le gène *prospero* de la drosophile, un gène nécessaire à la différenciation des lignées neuronales [Hassan *et al.* 1997]. *PROX1* code un facteur de transcription de 737 AA ayant un poids moléculaire d'environ 83 kDa. Cette protéine contient plusieurs domaines fonctionnels putatifs en plus de son homéodomaine (Figure 16) [Elsir *et al.* 2012].

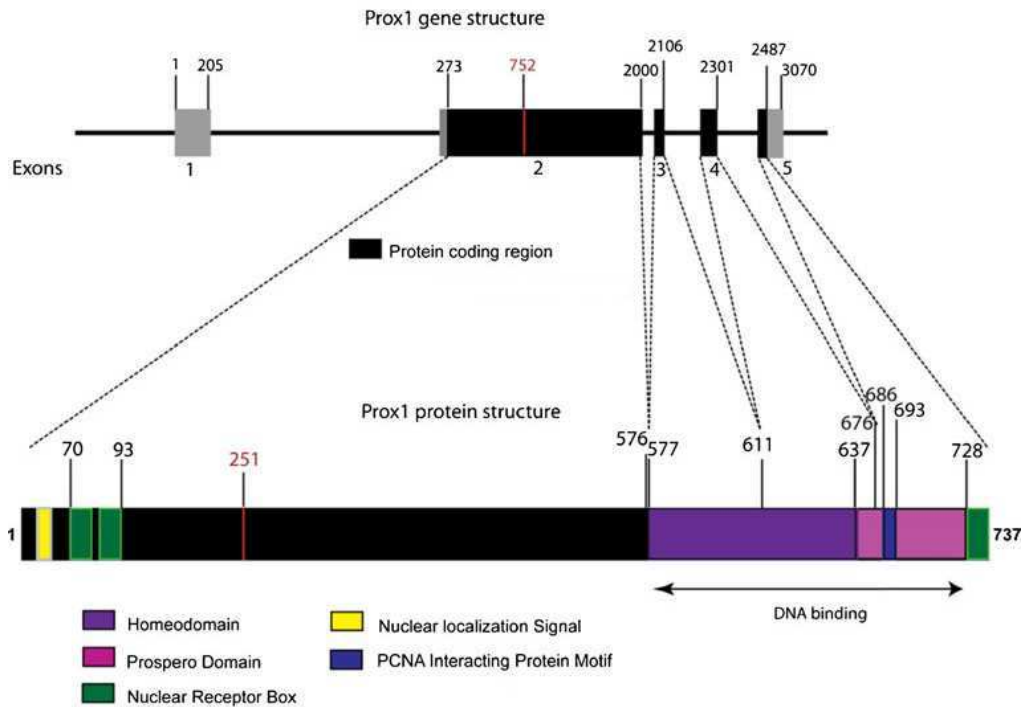


Figure 16 : Structure du gène et de la protéine PROX1 (d'après Elsir et al. 2012).

Les protéines possédant un domaine prospéro sont des homéoprotéines particulières qui contiennent un homéodomaine atypique et forment une famille unique d'homéoprotéines. L'homéodomaine est un domaine de liaison à l'ADN composé de 60 AA et constitue un groupe spécifique de facteurs de transcription avec un motif hélice-boucle-hélice. Les protéines prospéro possèdent deux domaines conservés nommés « Prospero Domain » 1 et 2 (PD1 et PD2). Il a été montré que PD2 est impliqué dans la fixation à l'ADN ainsi que dans la régulation de la localisation subcellulaire [Bi et al. 2003], mais la fonction de PD1 est encore inconnue.

La partie N-terminale de PROX1 contient 2 sites de fixation pour des récepteurs nucléaires (sites NR (Nuclear Receptor)) (Figure 16). Cette région contient également une séquence de localisation nucléaire (séquence NLS (Nuclear Localization Sequence)) et le domaine PD1. La région C-terminale de PROX1 est la plus conservée de la protéine : elle contient l'homéodomaine ainsi que le domaine PD2. Le domaine PD2 recouvre une séquence d'export nucléaire (NES (Nuclear Export Sequence)) dans l'homéodomaine et sa délétion empêche l'export de Prox1 du noyau. L'homéodomaine et le domaine PD2 forment un domaine homéoprospero héxa-hélical

continu et se fixe sur un site consensus (C(A/T)(C/T)NNC(T/C) et CGTCTT(A)) dans le sillon principal de l'ADN.

Les gènes à homéoboîte sont exprimés de façon restreinte à la fois au niveau temporel et au niveau spatial et jouent un rôle crucial pour la spécification cellulaire lors du développement embryonnaire. Les protéines à homéodomaine sont des régulateurs transcriptionnels importants qui contrôlent de nombreux aspects de la morphogénèse et de la différenciation cellulaire. En effet, des études ont montré que PROX1 se fixe sur des récepteurs nucléaires et module leur activité transcriptionnelle [Liu *et al.* 2003] [Qin *et al.* 2004].

2. Fonctions de PROX1

Chez la souris, *Prox1* est exprimé dans de nombreux tissus tels que le système nerveux central, la rétine, le cristallin, le pancréas, le foie et le cœur [Oliver *et al.* 1993]. Wigle *et al.* ont montré que des souris hétérozygotes pour *Prox1* meurent peu après leur naissance et les souris homozygotes mutantes sont létales à l'état embryonnaire (E15), suggérant que l'expression de *Prox1* est indispensable pour l'embryogenèse et la survie postnatale [Wigle *et al.* 1999].

a. Rôle de PROX1 dans les vaisseaux lymphatiques

PROX1 joue un rôle prépondérant dans la mise en place des vaisseaux lymphatiques. En effet, l'expression de *Prox1* débute au 9,5^{ème} jour de développement embryonnaire chez la souris et est spécifiquement localisée dans une sous-population de cellules endothéliales présentes au niveau d'un côté de la veine cardinale antérieure [Wigle *et al.* 1999]. A ce stade, l'endothélium veineux exprime également LYVE-1 (LYmphatic Vessel Endothelial hyaluronan receptor-1), un homologue de CD44 (Cluster of Differentiation 44), un régulateur du cycle cellulaire, et VEGFR-3 (Vascular Endothelial cell Growth Factor Receptor-3), un récepteur du VEGF-C et VEGF-D [Banerji *et al.* 1999] [Wigle *et al.* 1999] [Alitalo *et al.* 2002] [Wigle *et al.* 2002]. L'expression de ces récepteurs va ensuite être restreinte à l'endothélium lymphatique [Kaipainen *et al.* 1995] [Wigle *et al.* 2002]. L'expression polarisée de *Prox1* est la première indication que le processus moléculaire menant à la formation des vaisseaux lymphatiques a commencé. L'expression initiale est suivie par le bourgeonnement bipolarisé et la migration des cellules endothéliales lymphatiques (CEL) progénitrices

exprimant *Prox1* qui vont progressivement inhiber l'expression des gènes des vaisseaux sanguins tels que CD34 (Cluster of Differentiation 34) et la laminine et augmenter les niveaux d'expression de marqueurs des vaisseaux lymphatiques tels que VEGFR-3 [Wigle *et al.* 2002].

Chez les souris *Prox1*^{-/-}, le bourgeonnement et l'apparition des CEL des veines sont arrêtés à environ E11.5–E12.0 ; ces souris représentent les seuls modèles animaux complètement dépourvus de vaisseaux lymphatiques [Wigle *et al.* 1999]. PROX1 est donc essentiel pour le développement et la maintenance du système lymphatique ainsi que pour le devenir des CEL [Hong *et al.* 2002] [Hong *et al.* 2002] [Wigle *et al.* 1999]. Plus récemment, il a été montré que PROX1 joue également un rôle dans la régulation du cycle cellulaire des CEL [Baxter *et al.* 2011].

b. Rôle de PROX1 dans le pancréas

Il existe un modèle dynamique de l'expression de *Prox1* à travers tous les stades du développement du pancréas ainsi que dans les pancréas de souris adultes [Wang *et al.* 2005]. En effet, Burke *et al.* ont mis en évidence que *Prox1* est un des marqueurs précoces de la morphogenèse pancréatique chez les vertébrés et, dans les embryons de souris, le début de son expression coïncide avec l'émergence du canal pancréatique (à environ E9.0) [Burke *et al.* 2002].

Par ailleurs, Wang *et al.* ont montré que les souris *Prox1*^{-/-} (létales à l'état embryonnaire) présentent de nombreux défauts importants telles qu'une réduction de la taille du pancréas d'environ 60%, une diminution de son arborescence, une différenciation exocrine prématurée et une diminution de la production de précurseurs de cellules des îlots, lors de la phase de transition secondaire [Wang *et al.* 2005].

Une étude récente, réalisée par Westmoreland *et al.*, montre que la délétion spécifique de *Prox1* dans le pancréas de souris (souris *Prox1*^{ΔPanc}) entraîne de multiples altérations du pancréas exocrine telles qu'une différenciation prématurée des acini, une augmentation de la prolifération des cellules du canal pancréatique et une altération de la morphogenèse de ce canal [Westmoreland *et al.* 2012]. Ces défauts suggèrent que, lors du développement précoce du pancréas, *Prox1* contrôle l'expansion des cellules progénitrices et, durant les stades plus tardifs de l'embryogenèse, régule la prolifération et la morphogenèse des cellules du canal pancréatique. Les souris *Prox1*^{ΔPanc} présentent également des altérations mineures au

niveau des cellules des îlots, tels qu'un retard transitoire de leur genèse tendant à les rendre plus petits que les îlots de souris sauvages, une diminution en glucagon (cellules alpha) et une augmentation en somatostatine (cellules delta), en ghréline (cellules epsilon) et en cholecystokinine par rapport aux pancréas de souris sauvages. Cependant, le développement des cellules bêta n'est pas affecté chez les souris *Prox1* ^{Δ Panc}.

D'après ces études, PROX1 semble donc être un régulateur important du développement précoce du pancréas et la perte de fonction de PROX1 peut avoir des conséquences néfastes sur son organogénèse.

c. Rôle de PROX1 dans le foie

Une étude réalisée par Sosa-pineda *et al.* a montré que PROX1 contrôle la migration des hépatocytes durant la mise en place du foie [Sosa-Pineda *et al.* 2000]. En effet, les embryons de souris *Prox1*^{-/-} présentaient un foie 70% plus petit que celui des souris sauvages [Burke *et al.* 2002]. PROX1 est exprimé très tôt dans l'endoderme de la région ventrale de l'intestin antérieur. L'expression de *Prox1* est également détectée dans les cellules progénitrices hépatiques (hépatoblastes), dans les hépatocytes et les cholangiocytes en développement ainsi que dans les hépatocytes et les cholangiocytes matures [Burke *et al.* 2002]. Cette étude montre également que la perte de fonction de PROX1 affecte la délamination des hépatoblastes du bourgeon du foie et leur migration dans les lobes du foie [Sosa-Pineda *et al.* 2000]. Des études récentes montrent que *Prox1* induit également la prolifération des cellules progénitrices dans le foie fœtal via l'activation de gènes codant des protéines du cycle cellulaire telles que les cyclines D2, E1 et E2 et l'inhibition de l'expression de p16^{ink4a} [Kamiya *et al.* 2008].

Par ailleurs, Dufour *et al.* ont mis en évidence que PROX1 est impliquée dans le contrôle rythmique du métabolisme et dans la régulation de gènes du métabolisme dans le foie [Dufour *et al.* 2011]. En effet, PROX1, en interagissant avec ERR α (Estrogen-Related Receptor α) et PGC-1 α (Proliferator-activated receptor Gamma Coactivator-1 α) va se fixer au niveau de promoteurs de gènes du métabolisme et bloquer l'activité du complexe ERR α /PGC-1 α [Charest-Marcotte *et al.* 2010]. De plus, Song *et al.* ont montré que PROX1 interagissait avec HNF4 α (Hepatocyte Nuclear Factor 4 α) pour activer l'expression du gène *Cyp7a1* (Cholesterol 7-alpha-

hydroxylase), indispensable à la synthèse d'acides biliaires à partir du cholestérol, et du gène *Pepck* (Phosphoenolpyruvate carboxykinase), intervenant dans la néoglucogenèse [Song *et al.* 2006].

En plus de son rôle central dans le développement des organes, PROX1 semble également avoir un rôle important dans le métabolisme et le maintien de l'homéostasie à l'âge adulte.

d. Rôle de PROX1 dans les autres organes

i. Dans le cœur

Risebro *et al.* ont mis en évidence que *Prox1* est exprimé dans le cœur des embryons de souris et suggèrent que la perte de fonction de *Prox1* au niveau du cœur contribue à une létalité précoce (~E14.5) des souris *Prox1*^{-/-} [Risebro *et al.* 2009]. En effet, en utilisant des approches de délétion spécifique au niveau du cœur, ces auteurs ont découvert que les souris *Prox1*^{-/-} présentent une inhibition de l'expression et de la localisation des protéines sarcomériques, indispensables à la fonction cardiaque normale, une désorganisation des myofibrilles et un retard de croissance de leur cœur.

ii. Dans le système nerveux central

D'après plusieurs études, PROX1 a un rôle de régulateur important dans la neurogenèse, allant de la différenciation des cellules progénitrices à l'initiation de la neurogenèse [Kaltezioti *et al.* 2010]. PROX1 joue également un rôle important dans la neurogenèse à l'état adulte. En effet, des études ont montré que PROX1 est une cible de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine dans l'hippocampe des mammifères adultes, qui est une voie de signalisation clé dans la neurogenèse chez l'adulte [Karalay *et al.* 2011]. De plus, chez des souris mutantes *Prox1*, les cellules progénitrices intermédiaires sont absentes suite à une apoptose précoce dans la zone sous-granulaire du gyrus dentrate, zone essentielle pour la neurogenèse adulte, menant à une neurogenèse déficiente [Lavado *et al.* 2010].

iii. Dans l'œil

Des études ont montré que *Prox1* est essentiel à la mise en place des cellules horizontales de la rétine et est également impliqué dans le développement du cristallin [Dyer *et al.* 2003] [Wigle *et al.* 1999].

En effet, Cook *et al.* et Dyer *et al.*, ont montré que les souris *Prox1*^{-/-} ne possèdent pas de cellules horizontales [Cook *et al.* 2003] [Dyer *et al.* 2003]. De plus, les rétines de ces souris présentent un nombre important de cellules et la proportion des différents types cellulaires est altérée ; suggérant que PROX1 serait essentiel à la sortie du cycle cellulaire des rétino blastes.

De plus, une étude réalisée par Wigle *et al.* montre que, chez les souris *Prox1*^{-/-}, les cellules du cristallin prolifèrent de façon importante, présentent une diminution des marqueurs de la sortie du cycle cellulaire (Cdkn1b/p27^{kip1} et Cdkn1c/p57^{kip2}) et ne réussissent pas à polariser et à s'allonger correctement. Ces défauts entraînent alors la formation d'un cristallin creux [Wigle *et al.* 1999].

iv. Dans le cancer

Prox1 semble jouer un rôle en tant que gène suppresseur de tumeur. Plusieurs auteurs ont reporté des mutations ainsi que des méthylations aberrantes de l'ADN au niveau du locus *PROX1* tels que dans les carcinomes du système biliaire [Laerm *et al.* 2007] ainsi que dans les cancers du sein primaires et métastatiques [Versmold *et al.* 2007]. Dans certains cancers du pancréas chez l'homme, il a été mis en évidence que l'expression de PROX1 est diminuée, comparée aux tissus pancréatiques sains et cette réduction est corrélée avec le niveau de différenciation de la tumeur [Takahashi *et al.* 2006]. Cependant, une étude réalisée par Petrova *et al.* suggère que l'expression de PROX1 augmente la progression des tumeurs dans le colon en perturbant l'architecture tissulaire, la polarité cellulaire et l'adhésion [Petrova *et al.* 2008]. Cette étude a également montré que la voie de signalisation TCF/ β -caténine augmente l'expression de PROX1 dans les tumeurs intestinales mais pas dans les hépatocytes transformés, suggérant une réponse tissu spécifique de PROX1 à la voie TCF/ β -caténine [Petrova *et al.* 2008].

3. Gènes cibles de PROX1

PROX1 est un facteur de transcription, mais, actuellement, peu de ses gènes cibles potentiels ont été identifiés. Des analyses de co-transfections dans des lignées cellulaires épithéliales de cristallin montrent que PROX1 se fixe sur plusieurs promoteurs de gènes spécifiques du cristallin (B1 crystallin) [Lengler *et al.* 2001]. Dans les CEL, l'inhibition de PROX1 diminue l'expression de l'intégrine $\alpha 9$ et du VEGFR-3 [Mishima *et al.* 2007]. Shin *et al.* ont reporté 4 sites putatifs de fixation de PROX1 dans le promoteur de *FGFR-3* (Fibroblast Growth Factor Receptor-3) chez la souris qui sont similaires à 2 sites consensus de fixation des protéines prospéro : (C(a/t)(c/t)NN(t/c) et (T)AAGACG) [Hassan *et al.* 1997] [Cook *et al.* 2003]. Risebro *et al.* ont identifié les gènes codant les protéines de structure telles que l' α -actinine, la N-RAP, et la Zyxine comme étant des cibles directes de PROX1 dans le cœur chez la souris [Risebro *et al.* 2009]. Finalement, Sosa-Pineda *et al.* ont identifié le gène de la follistatine comme un gène cible de PROX1 dans les hépatoblastes de souris [Sosa-Pineda *et al.* 2000]. Aucun gène cible de PROX1 dans le pancréas n'est connu à ce jour.

Des études récentes ont montré que l'interaction de PROX1 avec certains membres de la famille des récepteurs nucléaires orphelins affecte l'activité transcriptionnelle de ces derniers. Chez le poisson zèbre, PROX1 interagit avec *Ff1b* (Fushi tarazu factor 1b), un homologue de SF-1 (Steroidogenic Factor 1), une protéine importante dans le développement du rein et cette interaction réduit l'activité transcriptionnelle de *Ff1b* [Liu *et al.* 2003]. Steffensen *et al.* ont également démontré que PROX1 interagit physiquement avec le récepteur LRH1 (Liver Receptor Homolog-1) [Steffensen *et al.* 2004] et Qin *et al.* ont mis en évidence que cette interaction empêche la fixation de LRH1 au niveau du promoteur de son gène cible : *cyp7a1*, un régulateur important de la synthèse d'acides biliaires [Qin *et al.* 2004]. PROX1 semble également être un antagoniste de l'activité d'autres récepteurs nucléaires via des interactions protéine-protéine directes telles qu'avec : HNF4 α qui joue un rôle central dans le métabolisme des lipoprotéines [Song *et al.* 2006], PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor- γ), un régulateur de l'expression de l'IFN- γ (impliqué dans la réponse inflammatoire et immunitaire) [Wang *et al.* 2008] et COUP-TFII (Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor II), un récepteur

nucléaire orphelin nécessaire au maintien de l'identité des cellules endothéliales veineuses [Lee *et al.* 2009].

4. Régulation de l'expression de *PROX1*

La régulation de l'expression de *PROX1* dans les différents tissus est peu connue. Petrova *et al.* ont montré que, dans les tumeurs intestinales, la voie de signalisation TCF/ β -caténine augmente l'expression de *PROX1* [Petrova *et al.* 2008]. Francois *et al.* ont également mis en évidence que Sox18 (Sex determining region Y-box 1) induit le développement des vaisseaux lymphatiques via une activation directe de la transcription de *PROX1*, par fixation sur son promoteur proximal [Francois *et al.* 2008]. De plus, Zhao *et al.* proposent que *Prox1* est une cible en aval de la voie de signalisation du FGF (Fibroblast Growth Factor) durant le développement cellulaire des fibres du cristallin chez la souris [Zhao *et al.* 2008]. Dans le pancréas et plus particulièrement dans les cellules bêta, rien n'est connu concernant la régulation de l'expression de *PROX1*. [Zhao *et al.* 2008]

Matériels et méthodes

I. Etudes d'associations génétiques de *PROX1*

1. Etude HELENA

L'étude HELENA (HEalthy Lifestyle in Europe by Nutrition in Adolescence) est une étude transversale multicentrique randomisée sur des adolescents provenant de 10 centres de 9 pays européens : Athènes et Héraklion (Grèce), Dortmund (Allemagne), Gand (Belgique), Lille (France), Pecs (Hongrie), Rome (Italie), Stockholm (Suède), Vienne (Autriche) et Zaragoza (Espagne). Cette étude a pour but de mesurer les habitudes de vie et les statuts nutritionnels des adolescents par région, culture, statut socio-économique, âge et sexe. L'objectif de base de l'étude HELENA était d'obtenir des données précises et comparables d'une cohorte sélectionnée d'adolescents européens (garçons et filles âgées de 12 à 18 ans) sur un nombre important de paramètres liés à la nutrition et à la santé : régime alimentaire, choix et préférences de la nourriture, anthropométrie, indicateurs sériques des métabolismes lipidique et glucidique, statuts en vitamines et minéraux, marqueurs immunologiques, activité physique, marqueurs de la santé et marqueurs génétiques. Le développement précoce et la maintenance d'un mode de vie sain sont connus pour être des précurseurs importants de la réduction des maladies liées à la nutrition tels que l'obésité ou le DT2. L'adolescence est une période critique pour le développement de l'obésité et d'autres désordres associés. Les habitudes de vie se consolident durant cette période de la vie et les désordres liés à la nutrition tels que l'obésité, l'anorexie, la boulimie sont également fréquents [Moreno *et al.* 2008].

Trois mille huit cent soixante cinq adolescents ont été sélectionnés au hasard entre 2006 et 2007 dans les 10 écoles en utilisant un groupe d'échantillonnages proportionnel prenant en compte la répartition géographique au sein de chaque ville, le ratio écoles privées/publiques et le nombre de classes par écoles. Les données sur les habitudes de vie ont été collectées à l'aide d'un questionnaire détaillé, en accord avec les procédures standards. Le protocole a été approuvé par le comité d'éthique de chaque centre et un consentement écrit a été obtenu pour chaque adolescent et ses deux parents ou représentants légaux. La participation à l'étude était volontaire.

Une prise de sang a été réalisée après un jeûne de 10h sur un tiers des 3865 adolescents sélectionnés au hasard (soit 1155 adolescents) et utilisée pour les dosages biochimiques cliniques et les analyses génétiques. Ces échantillons de sang ont été envoyés dans un laboratoire central (IEL, Université de Bonn, Allemagne). Les concentrations de TG, cholestérol total, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol et glucose ont été mesurées par méthode enzymatique (Dimension RxL clinical chemistry system, Allemagne). L'insuline a été mesurée par un système immunologique avec un analyseur Immulite 2000 (DPC Biermann GmbH, Allemagne). Les échantillons sanguins destinés à l'extraction d'ADN ont été collectés dans un tube EDTA K3, stocké à l'IEL et envoyé ensuite au Laboratoire d'Analyses Génomique de l'Institut Pasteur de Lille. L'ADN a été extrait des globules blancs à l'aide du kit Puregene (QIAGEN) et stocké à -20°C .

Les mesures anthropométriques complètes, harmonisées et standardisées ont été strictement contrôlées. Les participants étaient pieds nus et en sous-vêtements et les mesures ont été prises par des médecins qualifiés. Le poids a été mesuré avec un pèse-personne électronique (SECA 861) et la taille a été mesurée avec un altimètre (SECA 225). Les tours de taille et de hanche ont été mesurés à trois reprises à l'aide d'un mètre non élastique (SECA 200). L'épaisseur du pli de peau a été mesurée trois fois à 6 endroits différents (au niveau des biceps, des triceps, sous les épaules, au-dessus de la crête iliaque, au niveau des cuisses et des mollets) en utilisant une pince de Holtain [Nagy *et al.* 2008]. Le score total a été calculé en faisant la somme de l'épaisseur des 6 plis de peau. Le pourcentage de masse grasse a été estimé à partir des mesures des plis de peau selon l'équation de Slaughter *et al.* [Slaughter *et al.* 1988]. L'IMC a été calculé ($\text{masse (en kg)}/\text{taille (en m)}^2$). Un adolescent est considéré comme obèse si son IMC est supérieur à la valeur définie par Cole *et al.* [Cole *et al.* 2000] correspondant à un $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ à l'âge de 18 ans. De même, un adolescent est considéré en surpoids si son IMC correspond à un IMC compris entre 25 et 30 kg/m^2 à l'âge de 18 ans. Les caractéristiques de la population HELENA sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Caractéristiques des sujets de l'étude HELENA.

n	1155
Hommes/femmes (%)	48,0/52,0
Age (ans)	14,7 ± 1,4
Tour de taille (cm)	72,4 ± 8,7
Ratio tour de taille/hanche	0,8 ± 0,1
Poids (kg)	58,4 ± 13,0
IMC (kg/m ²)	21,3 ± 3,8
Masse grasse (%)	23,8 ± 9,8
Glucose (mmol/L)	5,0 ± 0,4
Insuline (µIU/mL)	10,3 ± 7,7
HOMA-IR	2,2 ± 1,5
HOMA-B	136,2 ± 97,6
Cholesterol (mmol/L)	4,2 ± 0,7
HDL-cholesterol (mmol/L)	1,4 ± 0,3
LDL-cholesterol (mmol/L)	2,4 ± 0,6
Triglyceride (mmol/L)	0,8 ± 0,4

Données exprimées en moyenne ± SD ou en pourcentage.

L'intérêt de travailler chez les enfants ou les adolescents réside dans le fait qu'il existe moins de biais environnementaux que chez les adultes, notamment concernant la consommation de tabac, d'alcool, la prise de médicaments et les maladies chroniques. En effet, il a été montré que l'héritabilité génétique de l'IMC et du tour de taille semble plus élevée chez les enfants (77% [Wardle *et al.* 2008]) que chez les adultes (25 à 60% selon les études [Teran-Garcia *et al.* 2007]). L'étude réalisée par Wardle *et al.* a également montré que l'effet des facteurs environnementaux sur l'IMC et le tour de taille, chez les enfants, était plutôt limité, seulement 15% [Wardle *et al.* 2008]. D'après ces données, l'impact des facteurs génétiques est donc en théorie plus facilement détectable chez les enfants et les adolescents que chez les adultes.

2. Génotypage

a. Technologie KASPar

La technique de génotypage utilisée dans nos études est la technologie KASPar (sous-traitée par Genoscreen et KBioscience, Hoddesdon, Royaume-Uni). Ce système est basé sur la technique de FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer) homogène, qui permet la détection de SNPs sans étape de séparation, et sur la PCR (Polymerase Chain Reaction) compétitive spécifique d'allèle, qui permet d'avoir un fort pouvoir discriminatoire pour déterminer les allèles d'un locus particulier. Ce système utilise une Taq ADN polymérase sans activité exonucléase 3'-5' et permet le génotypage de SNP ou d'insertion/délétion. Les différentes étapes du génotypage par la méthode KASPar sont représentées dans la figure 17.

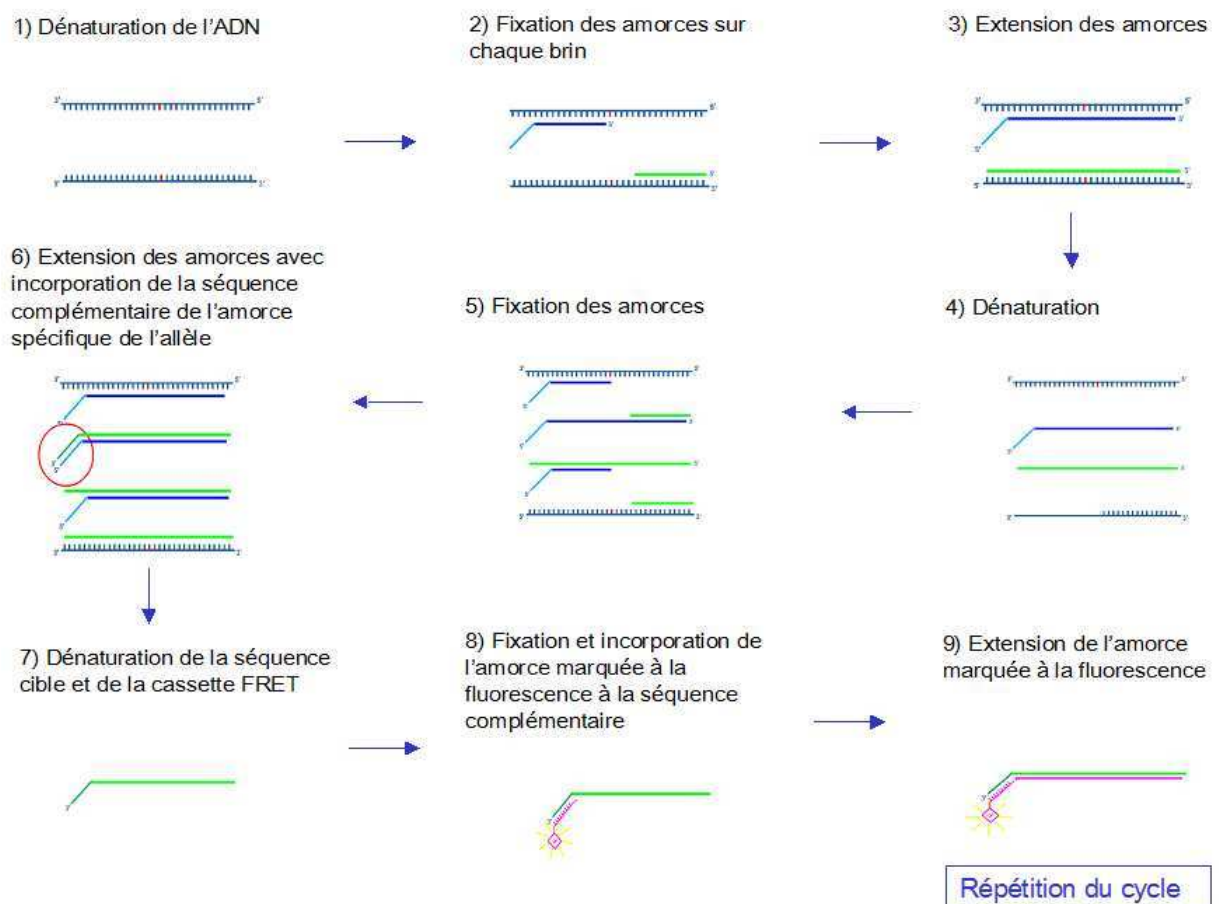


Figure 17 : Différentes étapes du génotypage par la méthode KASPar.

b. Imputation

L'imputation est une méthode statistique permettant d'estimer les génotypes de SNPs non génotypés à partir d'autres SNPs génotypés et d'un ensemble d'haplotypes connus issus d'un panel de référence des projets « HapMap » et « 1000 Genomes ». Les données des génotypes pour les 12 SNPs étudiés du gène *PROX1* ont été cartographiées grâce aux coordonnées du NCBI (Assembly Hg19) pour les apparier à la position génomique utilisée par le projet 1000 Genomes. Le logiciel « IMPUTE2 » a permis d'introduire les génotypes observés et d'imputer les génotypes manquants dans la région de *PROX1* (chr1:214,156,831-214,214,788; Build 37 coordinates; Assembly Hg19) [Howie *et al.* 2009]. Nous avons ainsi pu augmenter le nombre d'états du HMM (Hidden Markov Models) pour l'ensemble des données de l'étude afin d'avoir une plus grande précision et d'augmenter le nombre de taux de HMM pour l'imputation afin de prendre en compte tous les diplotypes de référence dans le panel de référence. La version du projet 1000 Genomes utilisée était celle de l'ensemble de variants intégrés de Phase I, basée sur les données de séquence du 23 novembre 2010 et du 21 mai 2011 et les phases des haplotypes de février 2012. Un total de 379 haplotypes de référence d'ancêtres européens ont servi de panel de référence. Le contrôle de qualité de l'imputation a été fait par observation de la mesure de l'information qui représente la mesure de l'information statistique observée associée à l'estimation de la fréquence allélique. Tous les SNPs avec une mesure de l'information au-dessus de 0,80 ont été inclus dans les analyses d'associations.

3. Analyses statistiques

Dans l'étude HELENA, l'équilibre d'Hardy–Weinberg a été testé grâce à un test du χ^2 . Les analyses statistiques (ANCOVA) ont été réalisées à l'aide des logiciels SAS ou SNPTEST [Slaughter *et al.* 1988]. Ce dernier est couramment utilisé dans le cadre d'analyses d'association dans les GWAS car il permet d'analyser des génotypes imputés en prenant en compte ou non l'incertitude de l'imputation.

Afin d'obtenir une distribution normale, une transformation logarithmique a été appliquée pour les TG et l'insuline plasmatique, ainsi que les index HOMA-IR et HOMA-B. Un modèle linéaire général multivarié additif comprenant un test de score

de vraisemblance pour les données manquantes a été réalisé pour chaque variable. Les données ont été ajustées sur l'âge, le sexe, l'IMC et le centre.

Les associations dont la valeur p était $\leq 0,05$ étaient considérées comme nominalement significatives. Cependant, plus on réalise de tests statistiques plus le risque d'obtenir des résultats faux-négatifs est élevé. Afin de prendre en considération l'augmentation de ce risque, les résultats des tests statistiques doivent être corrigés [Storey *et al.* 2003] [Karsten *et al.* 2004]. Pour cela, une correction pour test multiple a été appliquée en divisant le seuil de 0,05 par le nombre de SNPs indépendants (tagSNPs) (estimé grâce à l'outil SNPtagger exécuté dans Haploview 4.2 (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>) avec un seuil r^2 de 0,80). Nous avons ainsi identifié 17 tagSNPs dans notre étude et réévalué le seuil de significativité à $p \leq 0,00295$.

La puissance statistique de l'étude a été estimée grâce au logiciel Quanto v1.2.4 [Gauderman *et al.* 2006].

Concernant les études moléculaires, les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) en utilisant un test exact non-paramétrique de Mann & Whitney.

II. Etudes de la fonctionnalité moléculaire de PROX1

1. Lignées cellulaires

Les études GWA ont montré que PROX1 semble être impliqué dans la sécrétion d'insuline (influence des SNPs sur le HOMA-B ou autre variable apparentée) [Dupuis *et al.* 2010] [Voight *et al.* 2010]. Nous avons voulu comprendre le rôle joué par PROX1 dans le développement du DT2 et nous nous sommes donc particulièrement intéressés à son rôle au niveau de la sécrétion d'insuline. Pour cela, nous avons travaillé sur des lignées de cellules β -pancréatiques. Actuellement, plusieurs lignées de cellules β -pancréatiques sont disponibles mais peu de cellules montrent une réponse normale à la présence de glucose dans une gamme physiologique [Skelin *et al.* 2010] ; la plupart des lignées cellulaires β -pancréatiques transformées présentent une hypersensibilité au glucose [Efrat 2004]. Dans la littérature, les lignées cellulaires MIN6 et INS-1 sont connues pour refléter au mieux les conditions physiologiques car elles répondent à une stimulation au glucose et

expriment la glucokinase (enzyme impliquée dans l'étape initiale de l'utilisation du glucose par les cellules β -pancréatiques et le foie).

a. La lignée β -pancréatique de souris MIN6

Les cellules MIN6 proviennent d'insulinome de souris transgénique C57BL/6 exprimant un plasmide contenant le promoteur de l'insuline et l'antigène T. Elles forment des sortes d'îlots, expriment GLUT2 et la glucokinase et répondent au glucose dans une gamme physiologique en présence de nicotinamide [Miyazaki *et al.* 1990].

Les cellules MIN6 nous ont été fournies par l'équipe du Pr Bart Staels (INSERM U1011) et ont été cultivées dans du milieu DMEM-Glutamax (Dulbecco's Modified Eagle Medium-Glutamax) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Life Technologies), 2 mM de L-glutamine (Life Technologies), 100 μ M de β -mercaptoéthanol (Sigma) et 100 unités/ml de pénicilline/streptomycine (Life Technologies) à 37°C et avec 5% de CO₂.

Au cours de ma thèse, j'ai pu observer que les cellules MIN6 avaient perdu leur capacité de sécrétion d'insuline suite à un traitement au glucose et ce malgré la décongélation de plusieurs ampoules de cellules. Je n'ai donc pas pu tenir compte des résultats obtenus sur cette lignée concernant leur sécrétion d'insuline suite à un traitement au glucose. Dans la littérature, il a été observé à plusieurs reprises que les cellules MIN6 peuvent soudainement perdre leur capacité de sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Ce phénomène peut être dû à un important développement de cellules répondant peu au glucose ou à une expression réduite des gènes responsables de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose [Miyazaki *et al.* 1990].

b. La lignée β -pancréatique de rat INS-1E

En 1992, Asfari *et al.* ont généré une lignée cellulaire d'insulinome de rat induit par radiation aux rayons X : les cellules INS-1 [Asfari *et al.* 1992]. Elles synthétisent la proinsuline I et II et présentent de nombreuses caractéristiques de cellules β -pancréatiques telles qu'une concentration en insuline élevée et une réponse au glucose (associée avec l'expression de GLUT2 et de la glucokinase) dans une gamme physiologique. Cependant, bien que ces cellules semblent répondre à une

gamme physiologique en glucose et qu'elles prolifèrent encore, le contenu en insuline est seulement de 20% par rapport aux cellules mères [Asfari *et al.* 1992]. Merglen *et al.* ont isolé un clone de ces cellules à partir des cellules parentales et les a nommées INS-1E. Ces cellules montrent un phénotype stable de cellule bêta différenciée jusqu'aux passages 116 et sont capables de sécréter de l'insuline en réponse à des concentrations élevées en glucose.

Les cellules INS-1E nous ont également été fournies par l'équipe du Pr Bart Staels et ont été cultivées dans du milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Life technologie), 1 mM de Na-pyruvate (Life technologies), 100 μ M de β -mercaptoéthanol (Sigma) et 100 unités/ml de gentamicine (Life technologies) à 37°C et avec 5% de CO₂.

2. Traitement au glucose pendant 24 ou 48h des cellules β -pancréatiques

Afin de mimer une hyperglycémie sur les cellules β -pancréatiques, ces dernières ont été traitées avec différentes concentrations en glucose. Dans un premier temps, $6,25 \cdot 10^6$ cellules ont étéensemencées dans des puits de plaques 6 puits. Vingt-quatre heures après, le milieu des cellules a été enlevé et remplacé par du milieu contenant 3 mM de glucose (concentration normale en glucose). Vingt-quatre heures encore après, le milieu des cellules a été une nouvelle fois enlevé et remplacé par du milieu contenant soit 3 mM soit 30 mM de glucose (afin de mimer une hyperglycémie). Les milieux complets ont été préparés en utilisant du DMEM sans glucose auquel a été ajouté du glucose afin d'obtenir des milieux contenant 3 mM ou 30 mM de glucose.

Pour vérifier que le traitement au glucose a bien fonctionné, 1h après, 1 mL de surnageant a été récupéré et la quantité d'insuline sécrétée a été mesurée grâce à un kit ELISA permettant de détecter l'insuline de rat ou de souris (Mercodia).

Vingt quatre ou quarante huit heures après le traitement avec 3 mM ou 30 mM de glucose, les protéines et les ARNs des cellules ont été extraits et analysés en Western blot et en qPCR, respectivement.

3. Modulation de l'expression de PROX1

Afin de mieux comprendre le rôle joué par PROX1 dans le métabolisme glucidique et plus particulièrement son impact sur la sécrétion d'insuline en réponse

au glucose, nous avons tenté de sous-exprimer et de sur-exprimer PROX1 dans les deux lignées cellulaires que nous avons ensuite traitées au glucose pendant 1h.

a. Sur-expression de PROX1

Afin de sur-exprimer PROX1 dans les lignées cellulaires β -pancréatiques, différents transfectants ont été testés (Lipofectamine (Invitrogen), Fugène (Roche), Exgen (Fermentas)) ainsi qu'une méthode d'électroporation (AMAXA). Différentes densités cellulaires ainsi que différents temps de transfection (24h et 48h) ont également été utilisés.

Pour les cellules MIN6, le meilleur taux de transfection a été obtenu en utilisant la lipofectamine avec un ratio ADN/Lipofectamine de 1:6. Cependant, les cellules MIN6 ne répondant pas au traitement au glucose, elles n'ont pas été utilisées pour l'étude de la sur-expression de PROX1.

Concernant les cellules INS-1E, aucune des différentes méthodes utilisées ne nous a permis d'obtenir un taux de transfection satisfaisant (moins de 1% de cellules transfectées). Il est connu dans la littérature que ces cellules sont très difficilement transfectables : la seule méthode connue à ce jour pour les transfecter est l'utilisation d'adénovirus, ce que nous n'avons pas pu réaliser dans notre laboratoire.

Suite à ces résultats, nous n'avons donc pas pu réaliser d'études de sur-expression de PROX1, que ce soit dans les lignées cellulaires MIN6 ou INS-1E.

b. Sous-expression de PROX1

Afin d'inhiber l'expression de PROX1, nous avons employé la technique de « silencing » grâce à des ARNs interférents (siRNA pour small interfering RNA) qui sont des petits ARNs double brin de 21 nucléotides. Ces derniers sont reconnus dans le cytoplasme de la cellule par un complexe protéique nommé complexe RISC (RNA Induce Silencing Complex) qui libère le brin complémentaire de l'ARN ou brin sens. Ce complexe va reconnaître son transcrite cible, un ARNm, par complémentarité des bases nucléiques. Ce système de reconnaissance assure la haute spécificité de ce mécanisme. Une fois la cible liée, la protéine Argonaute, appartenant au complexe RISC, va couper le transcrite au niveau du site de reconnaissance. Les deux morceaux du transcrite clivé vont être rapidement dégradés

via leurs extrémités par des exonucléases. La transfection de siRNA dans les cellules va donc détruire spécifiquement les ARNm ciblés, empêchant toute nouvelle traduction de la protéine codée par ces ARNm.

La technique de siRNA a été mise au point sur les cellules INS-1E grâce à l'utilisation de siGLO (Dharmacon) qui est un siRNA fluorescent permettant d'évaluer visuellement l'efficacité de transfection. L'émission de la fluorescence a été observée à l'aide d'un microscope inversé Axiovert 135TV. Différents transfectants commercialisés par Dharmacon (dharmafect 1 à 4) ainsi que différentes densités cellulaires (entre 3.10^4 et 2.10^6 cellules/puits de plaque 24 puits) et différents temps d'incubation (12h, 24h, 36h et 48h) ont été testés. Il s'avère que le meilleur taux de transfection obtenu était de 70% avec $1,2.10^6$ cellules/puits durant 48h avec le transfectant dharmafect 2 (Figure 18). Ces conditions ont été conservées dans la suite de notre étude mais nous sommes passés en plaques 6 puits afin d'obtenir plus de matériel cellulaire.

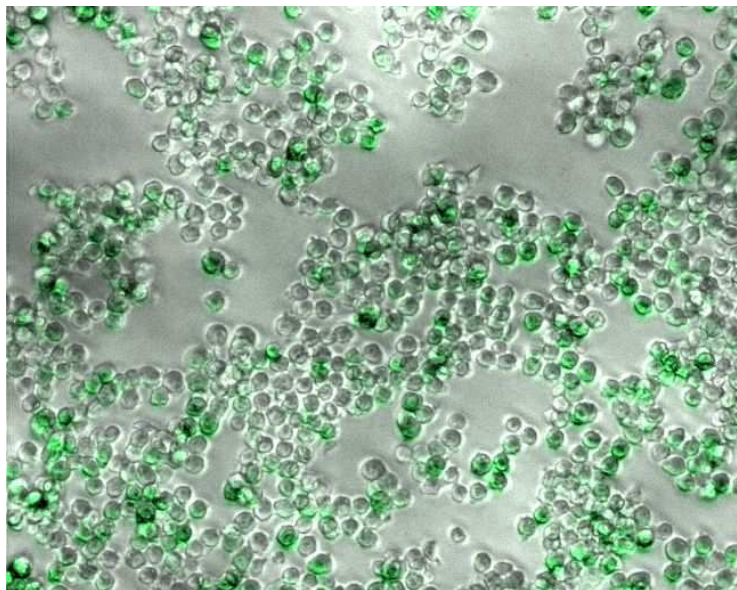


Figure 18 : Image au microscope inversé Axiovert 135TV de cellules INS-1E ($1,2.10^6$ cellules/puits de plaque 24 puits) transfectées avec le siGLO durant 48h avec le transfectant dharmafect 2.

Afin d'optimiser l'inhibition de l'expression de *PROX1* par siRNA, les cellules INS-1E ont étéensemencées dans des plaques 6 puits. Vingt-quatre heures après, les cellules ont été transfectées avec un pool de 4 siRNA différents dirigés contre l'ARNm de *PROX1* (appelés siPROX1 (Dharmacon)) afin d'augmenter l'efficacité

d'inhibition, ainsi qu'avec différentes concentrations de siRNA (100 nM, 120 nM et 150 nM), différents temps d'incubation (48h, 60h et 72h) et différentes quantités de Dharmafect 2 (2, 3 ou 4 μ l). En parallèle, des cellules ont été transfectées avec un pool de siRNA Non-Targeting (siNT), ne ciblant aucun ARN et servant de témoin négatif, ou avec un pool de siRNA ciblant la cyclophiline B (siCYCLO B) et dont l'efficacité est connue (témoin positif). Les meilleures conditions d'inhibition dans les cellules INS-1E ont été obtenues avec 120 nM de siPROX1 ou siCYCLO B et 4 μ l de Dharmafect 2, pendant 48h. Les protéines et les ARNs ont été extraits et analysés en Western blot et qPCR, respectivement.

4. Traitements au glucose pendant 1h des cellules β -pancréatiques

Afin d'étudier le rôle de PROX1 dans la sécrétion précoce d'insuline en réponse au glucose, un traitement au glucose d'une heure, suite à l'inhibition de PROX1 par les siRNAs, a été réalisé.

Ce traitement a été effectué avec du tampon Krebs préalablement préparé et contenant du NaCl (115 mM), du KCl (4,8 mM), du CaCl₂ (2,5 mM), du KH₂PO₄ (1,2 mM), du MgSO₄ (1,2 mM), du NaHCO₃ (20 mM), de l'HEPES (16 mM) et de la BSA FFA (Free Fatty Acids) (0,5%), avec un pH compris entre 7,4 et 7,8. Quarante-huit heures après le traitement avec les siRNA, le milieu des cellules a été enlevé et remplacé par 1 ml de tampon Krebs, pendant 1h. Le tampon Krebs a ensuite été retiré, puis remplacé par 0,5 ml de tampon Krebs contenant 3 mM ou 30 mM de glucose dans chaque puits, pendant 1h. Quatre cents microlitres de surnageant ont ensuite été récupérés puis centrifugés à 9000 rpm à 4°C, pendant 10 min. Le dosage de l'insuline sécrétée a été réalisé par un kit ELISA (Mercodia), selon les instructions du fabricant.

5. Traitements par les agonistes des PPARs

Pour évaluer si les différents PPARs (α , β/δ et γ) peuvent réguler l'expression de PROX1 dans les cellules INS-1E et MIN6, nous avons cherché à activer leur expression par des agonistes spécifiques. Pour activer spécifiquement PPAR α , PPAR β/δ et PPAR γ , nous avons utilisé, respectivement, le WY-14643 (Sigma aldrich), le L165041 (Sigma aldrich) et la troglitazone (Sigma aldrich) préalablement dilués dans du DMSO (DiMéthylSulfOxyde). Les cellules INS-1E et MIN6 ont été traitées avec 100 μ M de WY-14643, 1 μ M de L165041, 50 μ M de troglitazone ou du DMSO (témoin négatif) pendant 48h. Les différentes concentrations utilisées ont été choisies d'après la littérature [Kawai *et al.* 2002]. Un effet dose de la troglitazone a également été effectué sur les cellules INS-1E avec des concentrations de 5, 25 et 50 μ M. Les protéines nucléaires et les ARNs ont ensuite été extraits et analysés en Western blot et qPCR respectivement.

6. Western blot

L'optimisation du Western blot nous a conduit à extraire les protéines nucléaires de nos différents types cellulaires, afin de visualiser au mieux la protéine PROX1. Ce dernier étant un facteur de transcription, il est en effet présent dans le noyau. Pour cela, les cellules ont été lysées et les protéines cytoplasmiques et nucléaires ont été séparées à l'aide du kit NE-PER (Pierce) selon les instructions du fabricant.

Les protéines nucléaires ont ensuite été dénaturées dans du tampon dénaturant et du LDS (Lithium dodecyl sulfate) (NuPAGE®, Invitrogen) pendant 10 min à 90°C. Quarante microgrammes de protéines ont été déposés sur un gel d'acrylamide 4-12% (NuPAGE®, Invitrogen) et ont migré pendant 40 min à 200 V et 200 mA. Puis, les protéines ont été transférées sur membrane de nitrocellulose pendant 1h à 30 V et 400 mA. L'efficacité de transfert a été vérifiée grâce à la coloration des protéines par le rouge ponceau. Les membranes ont été saturées dans du lait à 5% dans du TNT 1X (Tris-base NaCl Tween 20 1X) pendant 1h, puis incubées, toute la nuit à 4°C, avec les anticorps primaires anti-PROX1 (Abcam référence 11941) dilués au 1/1000 et avec les anticorps primaires anti-RAN (RAs-related Nuclear protein) (Abcam référence 53775) dilués au 1/20000, servant de protéine de référence. Le lendemain, les membranes ont été lavées 3 fois, pendant 10 min, dans du TNT 1X puis incubées avec des anticorps secondaires anti-lapin couplés à la peroxydase, dilués au 1/10000

pour les deux protéines, pendant 1h à température ambiante. Les membranes ont, une nouvelle fois, été lavées 3 fois, pendant 10 min, dans du TNT 1X.

Pour visualiser les protéines, une étape de révélation a été réalisée en incubant les membranes, pendant 5 min, à température ambiante, avec de l'ECL (GE Healthcare) contenant le substrat de la peroxydase. Le produit de la réaction émet une chimiluminescence, proportionnelle à la concentration en protéines, révélée par une caméra Chemidoc (Biorad, Marnes la Coquette, France) ou un scanner Etan Dige (Biorad) qui restitue une image numérique du transfert de western. Le logiciel « ImageJ » nous a ensuite permis d'analyser par densitométrie, le taux relatif de marquage de la protéine et de quantifier les résultats en terme de densité optique.

7. Quantitative-PCR (qPCR)

Les ARNs totaux ont été extraits à l'aide du kit RNAeasy Plus mini Kit (Qiagen) selon les instructions du fabricant. Une étape de rétrotranscription a ensuite été réalisée à l'aide du kit SuperScript® VILO™ cDNA synthesis (Life Technologies), selon les instructions du fabricant, afin d'obtenir des ADNc (Acides DésoxyriboNucléiques complémentaires). Les réactions de qPCR ont été réalisées en duplicat dans des plaques 96 puits grâce au kit Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent) selon les instructions du fabricant.

La qPCR est une PCR quantitative en temps réel permettant la quantification du produit de la PCR de façon fiable et routinière. Au début de la réaction PCR, les réactifs sont en excès mais en concentration assez faible afin d'éviter que la renaturation des amplicons n'entre en compétition avec l'hybridation des amorces. L'amplification est alors réalisée de façon constante à un taux exponentiel à l'aide d'une ADN polymérase thermostable. Après la phase exponentielle, la réaction d'amplification entre dans une phase linéaire. Ensuite, apparaît une phase plateau où le taux d'amplification décroît à près de zéro générant très peu d'amplicons. Afin de recueillir des données quantitatives avec précision et de façon reproductible, chaque échantillon doit être analysé dans sa phase exponentielle d'amplification. Le suivi, en temps réel, de l'amplification de l'ADN se fait grâce à la détection et à la quantification de SYBR Green I qui est une molécule fluorescente. Lors de la réaction d'amplification par PCR, le SYBR Green I libre libère peu de fluorescence. Durant l'étape d'élongation, le SYBR Green I va s'insérer dans l'ADN double brin naissant. Le

signal de fluorescence va alors augmenter lors de l'étape de polymérisation jusqu'à décroître complètement lorsque l'ADN est dénaturé à l'étape suivante. L'augmentation de la fluorescence est donc proportionnelle à la quantité d'ADN présent. L'avantage de l'utilisation de SYBR Green I repose sur sa spécificité qui n'est pas affectée par des mutations dans l'ADN cible [Mackay *et al.* 2002]. En observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la réaction PCR.

Les valeurs de fluorescence sont enregistrées au cours de chaque cycle à l'aide du système QPCR Mx3000P (Agilent) et représentent la quantité d'amplicons produits en un point précis où le signal d'émission de fluorescence sera statistiquement et significativement plus élevé que le bruit de fond [Gibson *et al.* 1996]. Plus il y a de matrices à amplifier au départ de la réaction PCR, plus le nombre de cycles nécessaires pour atteindre ce point sera faible. Ce point est défini comme étant le cycle seuil (Ct (Cycle threshold)) et apparaîtra toujours au cours de la phase exponentielle d'amplification (Figure 19). Par conséquent, la quantification n'est pas affectée par l'épuisement d'un des réactifs comme lors de la phase plateau ce qui explique pourquoi le système en temps réel est si reproductible. La valeur du Ct peut être traduite en un résultat quantitatif en la comparant avec les valeurs du Ct générées avec des matrices de quantification connues [Bustin 2000].

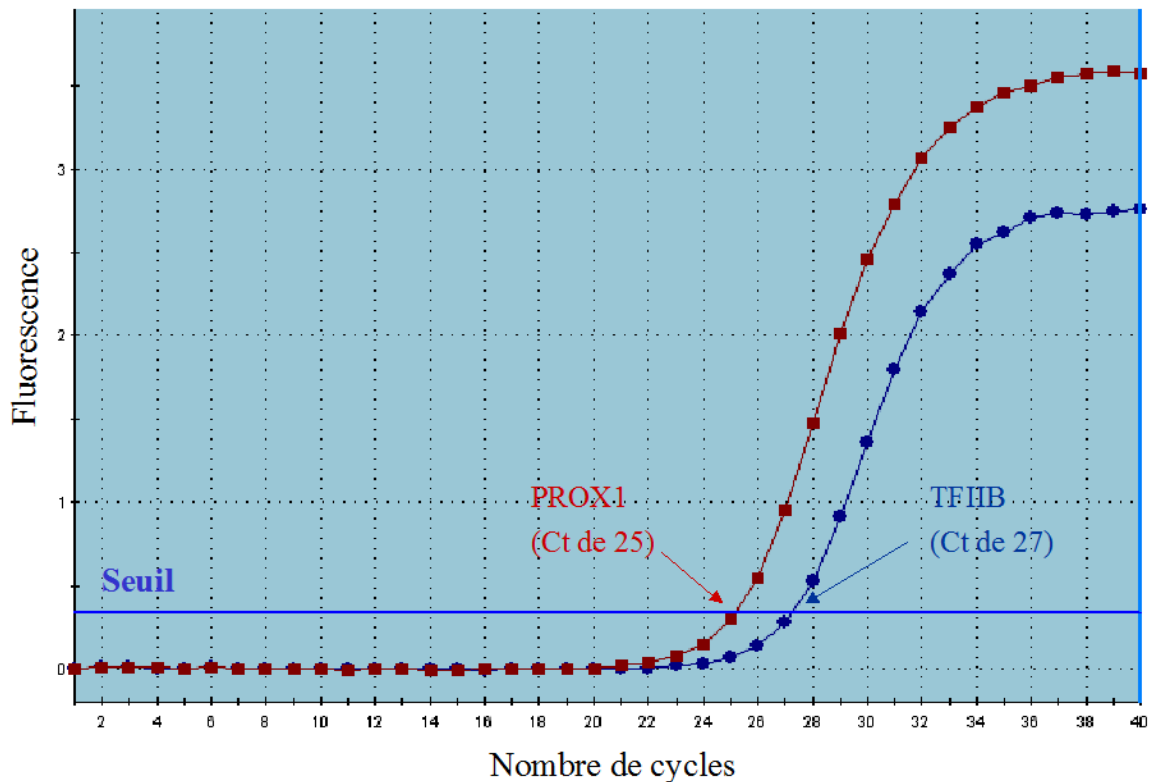


Figure 19 : Exemple d'amplification par qPCR où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles. L'intensité de la fluorescence à chaque cycle est proportionnelle à la concentration d'amplicons, le cycle seuil (Ct) représente le nombre de cycles requis où le signal d'émission de fluorescence est statistiquement et significativement plus élevé que la ligne de base.

Les amorces utilisées ont été sélectionnées à l'aide du programme Pick Primer du NCBI. Dans un premier temps, l'efficacité et la spécificité des amorces ont été testées sur des échantillons tests. Pour cela, le doublement de la quantité d'ADN a été vérifié à l'aide d'une gamme de dilution. L'efficacité des couples d'amorces était considérée comme correcte lorsqu'elle était comprise entre 90 et 110%. L'absence de dimère d'amorces a également été vérifiée grâce à une courbe de dissociation. Les séquences des amorces (sens et anti-sens) utilisées sont présentées dans le tableau 4.

Tableau 4 : liste des amorces sens et anti-sens utilisées pour les qPCR chez les rongeurs.

Utilisation	Gène	Amorce sens (5'→3')	Amorce anti-sens (5'→3')
Gène d'intérêt	PROX1	ACCCGTTACCCAGCTCCAACATGC	TTGATGGCTTGGCGGCATACTTC
Gène de référence	TFIIB	GTTCTGCTCCAACCTTTGCCT	TGTGTAGCTGCCATCTGCACCT
Contrôle positif traitement glucose	L-PK	TGGACATCATCTTTGCCTCCTT	CTGCTAACACGTCACCTGGCTTT
Contrôle positif siRNA	CYCLO B	TCGGCAAAGTTCTAGAGGGCATGGATG	ACCCACACAGACAGCTGCTTAGAGGG
Validation des analyses transcriptomiques	GCG	TACTTGGAGGGCCAGGCAGCAAAG	TCAGCATGTCTGCGCCCAAGTTCC
	GCGR	GTGCCACCACAACCTAAGCC	CTTTGTGGTACCAAGGTAGG
	GLUL	TTTAGCACCAAGGCCATGCGGGAG	TTCGTGGAATCCAGTCAGACGGCG
	IPMK	TTCTCCTGGAGCTGCGGAAACACC	GCTCTTCCGCCCAATCTTCACGTCC
	KCNN1	AGGAGTCTGTGCTCATTGCGCC	ATGGCAATCGCCAGTCATCGG
	MTHFD2	GCGGGCCATGGTTTCTGTTTCCTTG	GCTTCTTCCAGAAATGACCACGGC
	RAMP1	TCTGTGGTGTGACTGGGGAAAG	CTTCCGGATTGGGCCAGAAACA
	S100a4	AGCTGCCTAGCTTCTGGGGGTGAG	GCACATCATGGCAATGCAGGACAGG
	SCRT1	GCAGGAATCATGCCAGGTCCTTCC	GGCCCCACGTAGTCACTGAGGTATC
	SYNJ2	ATACCATGAGCGCCTCGACACCTG	CTCGGAGAACGGTGCGGAAAATTCC
	TNNI3	ATCAGCATGGCGGATGAGAGCAGC	TTTCTTGGCATGTGGCTCGGTGGC
	UBD	TGCAGACATGGCTTCTGCGTC	CGTCGCCCCACTCCACCAGA
	KLF14	TTTAAGCTGTGGTGCCCGGGAAGG	AGAGCTCATCCTCGCCGAGGTCTG
	ENPP3	CCGGATTTGCCGAAACGACTGCAC	TGTAACCGTGTGTTCCGCCTTCGC
	c-MYC	CCTGAATTCCTTTGGGAGGTG	CGTCGCAGATGAAATAGGGCTG
Contrôle traitements agonistes des PPARs	INS1	CATAGACCATCAGCAAGCAGG	CCAGGTGAGGACCACAAAGG
	HNF4a	TGGCATGGCCAAGATTGACAAC	ATTGGTGCCCATGTGTTCTTGC
	PAX6	TATCCCGGGACGTCAGTACCAG	GAGCCTCATCCGAGTCTTCTCC
	FATP	GTGTACCCCATCCGCTGTT	CAGTGGCTCCATCGTGTCTCCT
	CD36	TTCTGCTGCACGAGGAGGA	AATGAGCCACAGTCCGAT
	PPAR α	GTACCACTACGGAGTTCACGCAT	CGCCGAAAGAAGCCCTTAC
	PPAR γ	CACAATGCCATCAGGTTTGG	CAGCTTCTCTTCTCGGCCT
	CPT1a	CTGGTGGGCCACAAATTACG	AGGTAGATATATTCTCCACCAGTCA
	ACO	CAGATAATTGGCACCTACGCC	AAGATGAGTTCGGTGGCCC
	Contrôle expression de facteur de transcription	GATA1	AGGTGGCTGAATCCTCTGCATC
PITX1		AGTCGTCTGACACGGAGCTG	GCTGCTTCTTCTTCTGGCTGG
HOXA5		ACCCATATTTGGGTGCCTACG	TGTGTGCTTGATTTGTGGCTCG

Afin de pallier aux biais de manipulation, les quantifications ont été réalisées en utilisant le gène *TFIIB* comme gène de référence et le ratio gène d'intérêt / gène de référence a été calculé. Les valeurs sont ensuite présentées comme le ratio de l'échantillon test par rapport à l'échantillon contrôle.

8. Retard sur gel

Les protéines nucléaires des cellules MIN6 et HepG2 ont été extraites à l'aide du kit NEPER (Pierce, Rockford, IL). Les séquences des sondes (sens et anti-sens, respectivement) sont les suivantes : rs340835 (caatgcttgctcgagggttA/Ggagaggtttatg aatttatg, cataaattcataaacctctccaaccctcgagcaagcattg), rs340873 (ggtaaatattcctctct ctG/Aataattggactggagataa, ttatctccagtcctcaattatcaggaagaggaatatttacc), rs340874 (taa ggtgtggaaaggtataC/Tagcccttactcctaccagtt, aactggtaggagtaagggctgtataccttccacacctta). La sonde sens a été marquée à la Digoxygénine (DIG). L'annealing des brins sens et anti-sens a été réalisé en mélangeant les deux brins de façon équimolaire. Puis le mélange a été placé dans un thermocycleur à 95°C.

Le retard sur gel a été réalisé à l'aide du kit Dig gel shift 2nd generation (Roche Applied Science, Meylan, France) selon les instructions du fabricant. Le mélange contenant 5 µg d'extraits nucléaires, 1X de tampon de fixation, 1 µg/µl de poly (dI-dC), 0,1 µg/ µL de poly L-lysine et 2 pmol de sonde marquée à la DIG a été préparé et placé à température ambiante durant 15 min. Un mélange ne contenant pas d'extraits protéiques a également été incubé avec les sondes marquées et a été utilisé comme contrôle négatif. Une compétition a également été réalisée en utilisant un excès de sondes non marquées (50 fois) pour chaque SNP et 5 µg d'extraits nucléaires. Un gel de polyacrylamide à 6 % dans du TBE (Tris-HCL Borate EDTA) 0,5x a pré-migré durant 30 min avant que les échantillons ne soient chargés sur le gel. Les échantillons ont ensuite été transférés sur une membrane de nylon à ~15V durant 45 minutes. Puis, la membrane a été lavée dans un tampon de lavage provenant du kit DIG wash and block buffer set (Roche Applied Science) pendant 5 min à température ambiante. Elle a ensuite été incubée dans 100 ml de solution de saturation durant 30 min à température ambiante. L'anticorps anti-digoxigénine (Roche Applied Science) a été dilué au 1/10,000 dans 40 ml de solution de saturation et placé sur la membrane durant 30 min à température ambiante. Ensuite, la membrane a été lavée dans du tampon de lavage 2 fois pendant 15 min. La membrane a été placée dans 20 ml de tampon de détection et incubée durant 5 min à température ambiante. Le substrat chimiluminescent CDP-*Star* (Roche Applied Science) a été dilué au 1/1000 dans du tampon de détection et placé sur la membrane pendant 5 min. La chimiluminescence a été visualisée à l'aide de la caméra Chemidoc.

9. Analyses transcriptomiques

a. Puces à ADN

Afin de mettre en évidence les voies moléculaires impliquant PROX1, nous avons réalisé des analyses transcriptomiques à l'aide de puces à ADN afin de comparer les transcriptomes de cellules INS-1E dans lesquelles *PROX1* a été inhibé (siPROX1) aux transcriptomes de cellules INS-1E « wild type » (siNT). En effet, cette technologie permet d'évaluer le niveau relatif d'accumulation des transcrits de gènes dans une cellule, un tissu, un organe, un organisme ou encore un mélange complexe, à un moment donné et dans un état donné par rapport à un échantillon de référence.

Ces analyses transcriptomiques ont été réalisées en collaboration avec le Laboratoire d'Études Transcriptomiques et de Génomique Appliquée de l'Institut Pasteur de Lille (Dr David Hot).

Les ARNs de 4 échantillons siPROX1 et de 4 échantillons siNT (obtenus par la méthode décrite au paragraphe 3.b de la partie Matériels et Méthodes) ont été extraits à l'aide du kit RNAeasy Plus mini Kit (Qiagen) selon les instructions du fabricant. L'ARN est une molécule thermodynamiquement stable mais qui peut être rapidement digérée en présence de RNase. La formation de ces fragments pouvant compromettre l'efficacité des analyses, il est nécessaire de vérifier la qualité des ARNs avant de réaliser les analyses transcriptomiques. Pour cela, une électrophorèse capillaire, permettant la séparation de l'ADN, de l'ARN et des protéines, a été utilisée grâce au Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) (Figure 20) [Schroeder *et al.* 2006]. Ce dernier permet, selon le profil électrophorétique, de calculer un score spécifique de la qualité appelé RIN (RNA Integrity Number). Les valeurs de RIN vont de 1 (ARN totalement dégradé) à 10 (ARN intact) (Figure 20) [Schroeder *et al.* 2006]. Dans nos expériences, nous avons considéré que les ARNs étaient de qualité suffisante lorsqu'ils avaient un $RIN \geq 6$.

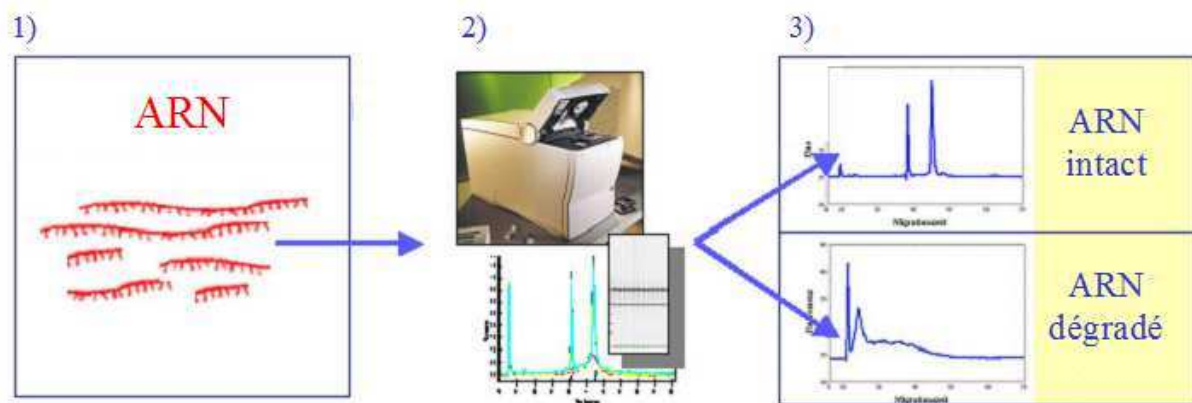


Figure 20 : Principe de l'analyse de la qualité des ARNs par le bioanalyser.

(1) Rôle de l'ARN dans l'expression du gène et la production de protéine, (2) molécules d'ARN extraites et mesure du profil électrophorétique avec l'aide du Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) et (3) attribution d'une qualité d'intégrité à l'échantillon d'ARN (d'après Schroeder *et al.* 2006).

Les ARNs extraits des cellules ont été rétrotranscrits en ADNc avec incorporation d'un promoteur de l'ARN polymérase T7 grâce à une amorce tagguée. Ces ADNc servent ensuite de matrice à l'ARN polymérase T7 pour la synthèse d'ARN complémentaires (ARNc) *in vitro* marqués avec de la cyanine 3 (fluorochrome vert) ou de la cyanine 5 (fluorochrome rouge) (Figure 21). Ces ARNc marqués sont alors déposés sur une lame de verre, appelée puce (microarray) sur laquelle sont fixées des dizaines de milliers de sondes, recouvrant ainsi tous les gènes présents dans une cellule. Les ARNc vont alors s'hybrider sur ces sondes (Figure 21). Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé une puce à ADN 4*44K Whole Rat Genome Oligo Microarray (Agilent).

Après plusieurs étapes de lavages, seules les séquences spécifiques fortement liées resteront hybridées. Les ARNc marqués à la fluorescence fixés à une sonde vont alors générer un signal dont l'intensité dépendra de la quantité d'ARNc, de la force de l'hybridation déterminée par le nombre de paires de bases, les conditions d'hybridation (comme la température) ainsi que les lavages. Ensuite, chaque spot de la puce va être analysé individuellement par un scanner à très haute résolution (InnoScan700 (Innopsys)), et ce à la longueur d'onde d'excitation de la cyanine 3 puis de la cyanine 5 (Figure 21). L'image scannée va être traduite en niveaux de gris. La première étape de l'analyse des résultats consiste à normaliser les données des différentes puces et à éliminer le bruit de fond à l'aide du logiciel Mapix. L'intensité du signal entre le vert et le rouge va ensuite être comparée. À chaque spot est attribué une valeur d'intensité normalisée et chacune des valeurs est analysée grâce au package LIMMA (Linear Models for MicroArray data) [Smyth *et al.* 2003] permettant d'estimer l'intensité d'expression d'un gène.

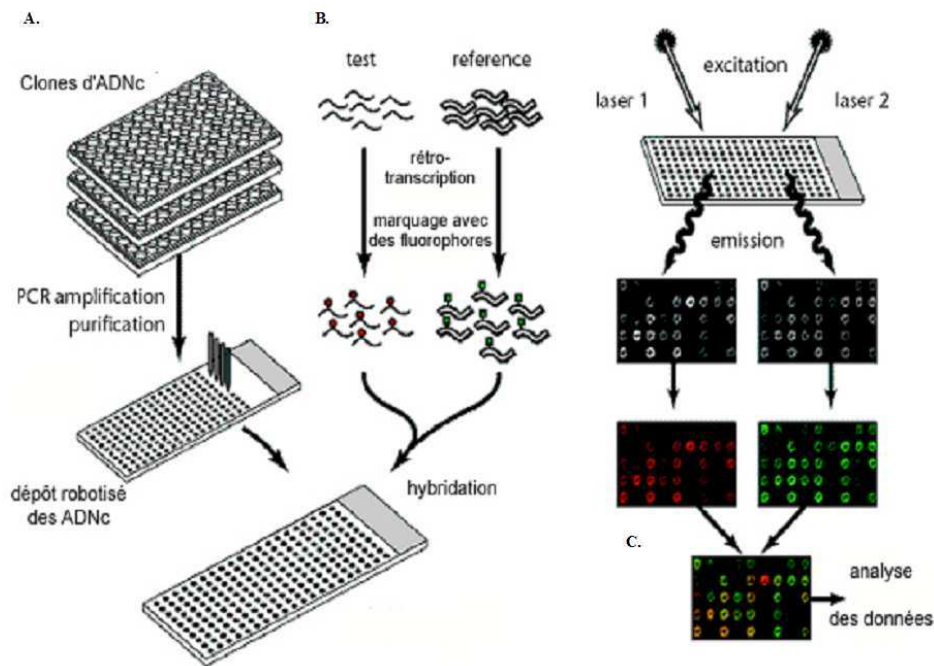


Figure 21 : Principe de la technologie des puces à ADN. (A) Les séquences des sondes sont déterminées de façon à optimiser leur spécificité et leur sensibilité. Les sondes synthétisées sont déposées par un robot sur la surface de la lame selon un plan défini. (B) Les ARNm sont extraits des échantillons biologiques à comparer, rétro-transcrits et marqués avec deux fluorochromes différents puis mélangés avant hybridation. (C) La lecture des lames est réalisée par un scanner (microscope à fluorescence) couplé à un photomultiplicateur (PMT). L'image est alors analysée de façon à quantifier le signal. Les données sont ensuite normalisées, analysées et interprétées (d'après Duggan *et al.*).

L'analyse va ensuite consister à établir une liste de gènes dont l'expression est significativement différente entre les échantillons, puis à les classer par famille et par niveau d'expression afin d'établir des hypothèses physiopathologiques. Le test t dont la variance est calculée par une approche Bayésienne empirique [Lonnstedt *et al.* 2005] est la méthode la plus couramment utilisée lors des analyses transcriptomiques pour évaluer si la différence observée entre 2 échantillons est significative. L'analyse des données est complexe, car elle nécessite la comparaison de dizaines de milliers de données ; une correction pour test multiple est donc nécessaire.

Par ailleurs, même si les puces à ADN sont désormais une technologie fiable, la présence potentielle de faux positifs nécessite que les résultats soient validés par d'autres techniques comme la qPCR.

b. Logiciel IPA

IPA (Ingenuity Pathways Analysis) est un logiciel qui permet de modéliser, analyser et comprendre les systèmes biologiques et chimiques complexes (www.ingenuity.com). Il permet de comprendre la biologie à de multiples niveaux en intégrant les données d'une variété de plates-formes expérimentales (ici, les résultats de l'analyse transcriptomique) et en fournissant un aperçu des interactions moléculaires et chimiques, des phénotypes cellulaires et des processus pathologiques de notre système (Figure 22).

IPA offre également un accès à des informations précises et détaillées actuellement disponibles sur les gènes, les médicaments, les produits chimiques, les familles de protéines, les processus cellulaires et pathologiques, ainsi que sur les voies de signalisation et les voies métaboliques.

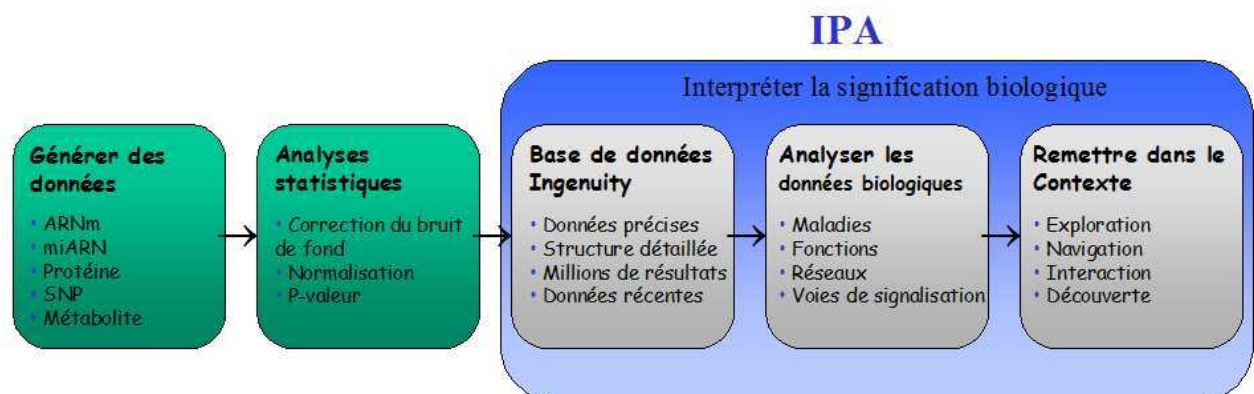


Figure 22 : Principe de l'analyse de données par le logiciel IPA.

Les données obtenues par analyse transcriptomique ont été analysées avec ce logiciel. Pour cela, la fonction « core analysis » a été sélectionnée ainsi que les espèces homme, souris et rat afin d'avoir un maximum d'informations disponibles.

IPA a ensuite généré des réseaux et les a classés en fonction d'un score de significativité moyen. De plus, la significativité des fonctions biologiques et des voies canoniques a été testée grâce à un test exact de Fisher. Les fonctions biologiques ont ensuite été groupées en : maladies et troubles pathologiques, fonctions moléculaires et cellulaires ou fonction et développement de système physiologique. De même, les

voies canoniques ont été groupées en voies métaboliques ou en voies de signalisation. Les voies canoniques ont également été classées par la valeur du ratio du nombre de molécules que l'on a retrouvé dans une voie donnée sur le nombre total de molécules qui constituent cette voie. IPA nous a également permis de générer des réseaux où les gènes différentiellement régulés ont pu être reliés en fonction des relations entre gènes ou protéines, connues dans la littérature, indépendamment des voies canoniques.

Résultats

I. Contexte

Suite à l'article publié par Harvey *et al.* en 2005, montrant que des souris hétérozygotes pour *Prox1* présentaient une hyperinsulinémie et une obésité à l'âge adulte [Harvey *et al.* 2005], et aux études GWA décrivant l'association de polymorphismes de *PROX1* avec la glycémie à jeun et le DT2 [Dupuis *et al.* 2010], nous avons réalisé des études génétiques et moléculaires pour tenter de comprendre l'implication de *PROX1* dans le développement du DT2.

Les différentes études d'associations génétiques sur le DT2 ont montré que le gène *PROX1* joue un rôle dans l'apparition de cette maladie et plus particulièrement dans la sécrétion d'insuline. Cependant, ces études ne se sont intéressées qu'à un seul SNP de *PROX1* (le SNP rs340874). Dans la première partie de ma thèse, j'ai réalisé des études d'associations portant sur l'ensemble de la variabilité commune connue du gène *PROX1* (80 SNPs) et différents paramètres biochimiques (insuline, glucose, HOMA-B, HOMA-IR, lipides,...) et anthropométriques (poids, IMC, RTH,...), dans une population d'adolescents (étude HELENA). L'étude de la fonctionnalité des SNPs associés a également été réalisée afin de tester leur impact sur la variabilité de l'expression de *PROX1* (voir article).

Dans la seconde partie, comme rien n'était décrit au niveau moléculaire concernant le rôle de *PROX1* dans l'apparition du DT2, j'ai réalisé des expériences moléculaires et cellulaires pour évaluer son rôle, notamment au niveau de la sécrétion d'insuline des cellules β -pancréatiques. Pour cela, dans un premier temps, j'ai vérifié si l'expression de *PROX1* était modulée dans les cellules β -pancréatiques en réponse à une hyperglycémie. Ensuite, j'ai étudié l'impact de la modulation de l'expression de *PROX1* et plus particulièrement de son inhibition sur la sécrétion d'insuline en réponse à une concentration élevée en glucose (voir article). En parallèle, je me suis intéressée à la régulation de l'expression de *PROX1*, notamment par les PPARs. Finalement, comme aucun gène cible de *PROX1* dans les cellules β -pancréatiques n'est connu à ce jour, j'ai cherché à identifier ses gènes cibles potentiels dans les cellules β -pancréatiques.

II. Article

III. Discussion de l'article

Dans l'étude HELENA, parmi les 80 SNPs testés, 3 SNPs de *PROX1* (rs340838, rs340837 et rs340836) sont significativement associés et 2 SNPs (rs340872 et rs340873) tendent à être associés à l'insulinémie. Les SNPs rs340838, rs340837 et rs340836 tendent également à être associés aux indices HOMA-B et HOMA-IR. Des études conditionnelles ont permis de montrer que toutes ces associations reflètent le même signal d'association.

Une méta-analyse réalisée par Barker *et al.* sur un total de 6 000 enfants et adolescents, montre que l'allèle C du SNP rs340874 de *PROX1* est associé à des concentrations de glucose plasmatique plus élevées (effet = +0,013 mmol/L, $p=0,042$) et (dans une moindre mesure) à un HOMA-B plus faible (effet = -0,016, $p=0,067$). Ces effets sont similaires à ceux observés chez les adultes [Barker *et al.* 2011]. Contrairement à cette étude, nous n'avons pas pu détecter d'association significative entre le SNP rs340874 et la glycémie. Ceci est dû à la taille de l'échantillon HELENA qui est trop petite pour pouvoir détecter une différence de 0,013 mmol/L (puissance=12%). Cependant, nos résultats sont en accord avec les données des méta-analyses car les porteurs de l'allèle à risque du SNP rs340874 ont un HOMA-B plus faible que les porteurs de l'autre allèle.

Nos résultats sont également cohérents avec ceux observés chez les adultes. En effet, la méta-analyse réalisée par Dupuis *et al.* a reporté des associations significatives entre l'allèle C du SNP rs340874 du gène *PROX1* et des concentrations de glucose plasmatique à jeun plus élevés (effet = +0,013 mmol/L, $p=6,6 \times 10^{-6}$) et le DT2 (OR=1,07, $p=7,2 \times 10^{-10}$) ainsi que des associations nominales entre cet allèle et un HOMA-B plus faible (effet = -0.008, $p=0,020$) [Dupuis *et al.* 2010]. Cependant, dans cette étude, les auteurs n'ont pas analysé l'impact des SNPs rs340838, rs340837 ou rs340836 (ou des SNPs en fort DL avec eux) de *PROX1* (communications personnelles du consortium MAGIC). Il est intéressant de noter que le SNP rs340874 est en DL modeste avec les SNPs rs340838, rs340837 et rs340836 ($r^2 \sim 0.60$). D'après nos résultats, ces SNPs auraient un effet plus important que le SNP rs340874 sur les phénotypes liés à l'insuline chez les adolescents. Des études de réplication dans des échantillons plus grands sont cependant nécessaires pour confirmer nos résultats.

Par la suite, nous avons tenté d'identifier les variants fonctionnels responsables de cette association. Bien que la meilleure association observée avec l'insuline soit pour le SNP rs340837, d'autres SNPs en fort DL avec ce dernier pourraient expliquer cette association. Comme tous les SNPs candidats potentiels (rs340875, rs340873, rs340872, rs340839, rs340838, rs340837, rs340836 et rs340835) ainsi que le meilleur SNP de la GWAS (rs340874) sont localisés dans la région 5' ou dans le premier intron du gène *PROX1* (Figure 23), nous avons fait l'hypothèse qu'ils pouvaient moduler son expression.

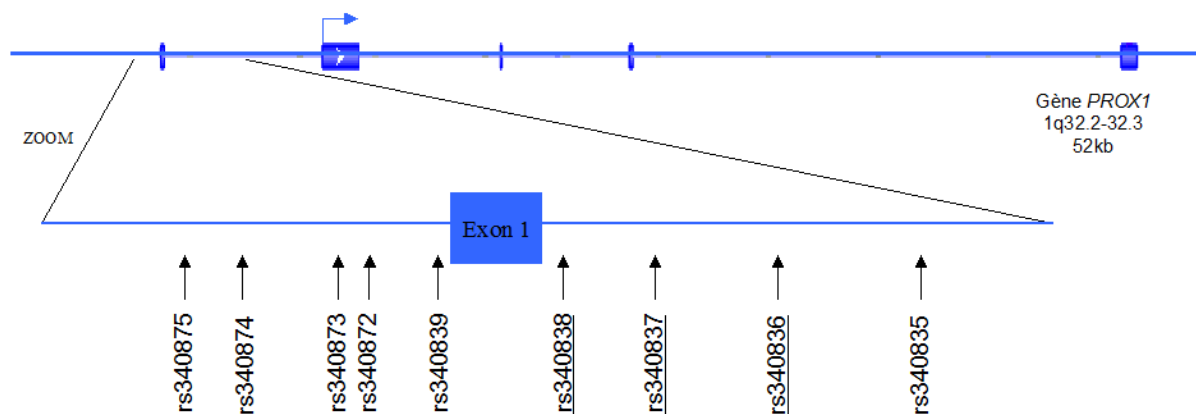


Figure 23 : SNPs du gène *PROX1* associés à l'insulinémie (soulignés) et ceux en DL avec eux.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé un vecteur rapporteur Luciférase contenant les allèles de ces 9 SNPs dans des hépatocytes humains (HepG2) et des cellules β -pancréatiques de souris (MIN6). Nous avons pu montrer que les allèles à risque des SNPs rs340873, rs340835 et rs340874 sont associés à une activité luciférase plus faible, à la fois dans les cellules HepG2 et dans les cellules MIN6 (sauf pour le rs340874 qui ne diminue l'activité Luciférase que dans les cellules HepG2), en particulier le SNP rs340835 (diminution d'environ 4 fois). Ces données suggèrent que l'expression de *PROX1* pourrait être diminuée dans les hépatocytes et les cellules bêta des individus porteurs de ces allèles. Le signal de l'association observé pourrait alors être expliqué par l'un de ces 3 SNPs fonctionnels (ou les 3 en même temps), même s'ils ne sont pas eux-mêmes statistiquement associés aux phénotypes insulinémiques (dû à une fréquence de l'allèle mineur légèrement plus basse ou un effet plus faible). D'autres expériences sont nécessaires pour préciser le mécanisme exact responsable de la diminution de l'expression de *PROX1*.

Par la suite, afin de vérifier s'il existe une différence d'affinité pour des facteurs de transcription entre les allèles des SNPs rs340835, rs340874 et rs340873, nous avons réalisé des expériences de retard sur gel à partir d'extraits nucléaires de cellules HepG2 et MIN6. Dans les cellules MIN6, nous n'avons pas mis en évidence de retard sur gel, suggérant qu'aucun facteur de transcription de ces cellules ne se fixe au niveau des séquences contenant les SNPs fonctionnels ou que les conditions expérimentales ne sont pas optimales. Concernant les cellules HepG2, nous avons observé des retards sur gel spécifiques pour les 3 SNPs ainsi qu'une différence d'affinité entre les allèles C et T du SNP rs340874. En effet, nous avons pu constater que l'allèle C du polymorphisme rs340874 fixe environ 60 % de facteurs de transcription en plus par rapport à l'allèle T. Par ailleurs, des analyses *in silico*, nous ont permis de voir que des sites putatifs de fixation pour les facteurs de transcription GATA-1, HOXA5 et PITX1 sont soit présents soit absents en fonction des allèles des polymorphismes rs340873 et rs340835. Cependant, ces facteurs de transcription ne sont pas vraiment pertinents dans le cadre du DT2. Par ailleurs, après vérification par qRT-PCR, les facteurs GATA-1, HOXA5 et PITX1, ne sont pas exprimés dans les cellules MIN6, ce qui pourrait expliquer l'absence de retard sur gel dans ce type cellulaire. La technique de gène rapporteur Luciferase est peut-être plus sensible que la technique de retard sur gel, ce qui pourrait expliquer la différence observée dans les cellules MIN6 entre ces deux types d'expériences. Concernant le SNP rs340874, aucun facteur de transcription n'a pu être mis en évidence par ces analyses. Pour la suite de cette étude, il serait intéressant de caractériser les facteurs de transcription qui se fixent au niveau du SNP rs340874.

Afin d'étudier les conséquences possibles d'une diminution de l'expression de PROX1 et pour comprendre le rôle joué par ce facteur de transcription dans la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, nous avons inhibé son expression dans des cellules β -pancréatiques de rat (INS-1E), à l'aide de siRNAs dirigés contre *Prox1*. Malgré l'utilisation de conditions optimales basées sur l'utilisation de données de contrôle positif de siRNA (cyclophiline B) et d'un pool de 4 siRNAs différents dirigés contre *Prox1*, nous n'avons obtenu qu'une inhibition d'environ 40% de *Prox1* dans les cellules INS-1E. D'autres conditions de transfection ont également été testées directement avec les siRNAs *Prox1*, mais nous n'avons pas pu obtenir de meilleure inhibition. Cependant, nous avons montré que l'inhibition d'expression de *Prox1* est

associée à une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose d'environ 2 fois. Notre étude est la première à montrer que PROX1 participe à la sécrétion d'insuline en réponse au glucose dans les cellules β -pancréatiques. Bien que Prox1 ne soit pas un acteur connu de la voie de sécrétion d'insuline, en tant que facteur de transcription, il pourrait réguler l'expression de gènes directement impliqués dans ce processus. Comme nous l'avons vu dans le chapitre VIII.2.b de l'introduction, Prox1 joue un rôle dans l'organogenèse du pancréas [Wang *et al.* 2005] [Westmoreland *et al.* 2012], notamment au niveau des cellules des îlots. De légères modifications de l'expression de *Prox1* causées par un ou plusieurs SNPs pourraient engendrer des altérations de la structure des îlots entraînant des modifications de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et mener, par la suite, à un DT2. Ces données sont en accord avec les données des GWAS montrant que la majorité des loci associés au DT2 sont associés à un défaut des cellules bêta [Billings *et al.* 2010].

Pour finir, le DT2 étant caractérisé par une hyperglycémie, nous avons étudié si la concentration en glucose régule l'expression de *Prox1*. Nous avons montré qu'une concentration élevée en glucose diminue l'expression de l'ARNm de *Prox1* mais augmente l'expression de la protéine PROX1 dans les cellules β -pancréatiques INS-1E. Bien que l'homogénéité entre les niveaux d'expression des ARNm et des protéines soit souvent admise, des exemples de divergence sont fréquents. Jayapal *et al.* ont montré que plus de 30% des gènes analysés chez *Streptomyces coelicolor* présentaient des divergences d'expression [Jayapal *et al.* 2010]. Chez la souris, des divergences d'expression ont également déjà été observées, par exemple pour l'interleukine 18 dans un modèle de cicatrisation cutanée [Kampfer *et al.* 1999]. Différents mécanismes post-transcriptionnels peuvent être à l'origine de cet effet tels qu'une stabilité de l'ARNm améliorée, une efficacité de traduction augmentée ou d'autres mécanismes. Cette situation peut également refléter un rétrocontrôle transcriptionnel négatif pour éviter l'excès de protéine. En tout cas, le glucose apparaît clairement moduler l'expression de *Prox1* dans les cellules β -pancréatiques *in vitro*.

En conclusion, les SNPs rs340838, rs340837 et rs340836 du gène *PROX1* semblent jouer un rôle important dans la régulation de l'insulinémie au niveau de la population. Dans notre étude, nous avons également montré, *in vitro*, que les allèles à risque des SNPs rs340874, rs340873 et rs340835 étaient associés à une diminution de l'expression du vecteur rapporteur Luciférase et que PROX1 participe à la

sécrétion d'insuline en réponse au glucose dans les cellules β -pancréatiques. Bien que les mécanismes exacts ne soient pas totalement compris, ces résultats représentent une première étape dans la compréhension de l'implication de PROX1 dans le DT2.

IV. Autres résultats non publiés

1. Étude de la régulation de *Prox1* par les PPARs dans les cellules INS1-E

Comme nous avons vu que les SNPs de *PROX1* qui sont associés au DT2 sont localisés dans les régions régulatrices du gène et que certains d'entre eux modulent l'expression de gène rapporteur, nous nous sommes intéressés à l'étude de la régulation de *Prox1* dans les cellules β -pancréatiques. A l'aide du logiciel Genomatix, nous avons recherché la présence de sites consensus pour des facteurs de transcription sur le promoteur et l'intron 1 du gène *Prox1*. Nous avons mis en évidence la présence de 11 PPRE (PPAR Response Element) au niveau du promoteur et de l'intron 1 du gène *Prox1* (Figure 24).

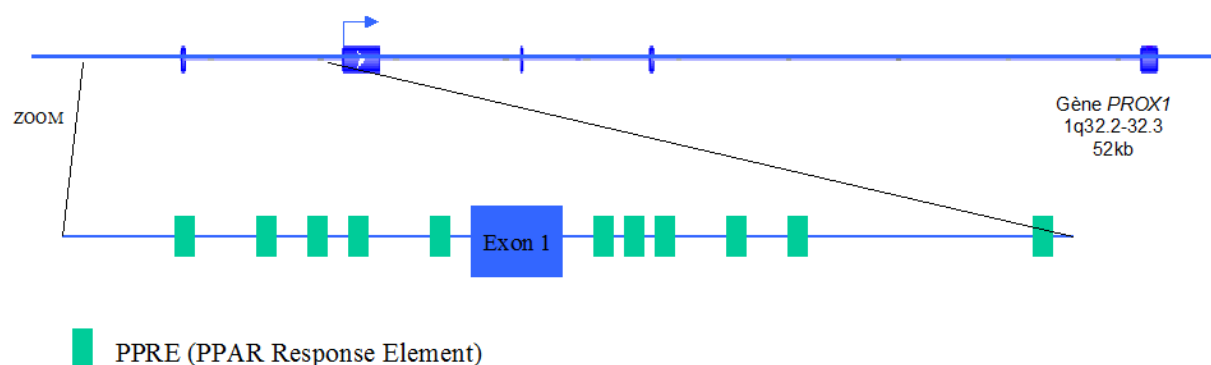


Figure 24 : PPRES présents au niveau du promoteur et de l'intron 1 du gène *PROX1*.

Les PPRES sont des sites consensus de fixation des PPARs. Ces derniers sont des facteurs de transcription connus pour jouer un rôle important dans la survenue du DT2, notamment $PPAR\gamma$ [Altshuler *et al.* 2000] [Ridderstrale *et al.* 2009]. En effet, les PPARs jouent un rôle physiologique important dans la captation des lipides, la régulation du métabolisme lipidique [Berger *et al.* 2002] et la sensibilité à l'insuline. De plus, les glitazones (agonistes synthétiques de $PPAR\gamma$) sont utilisés comme agent sensibilisateur à l'insuline chez les patients diabétiques. Afin de vérifier la régulation potentielle de l'expression de *Prox1* par les PPARs, les cellules β -pancréatiques INS-1E et MIN6 ont été traitées avec les agonistes spécifiques des 3 PPARs, comme expliqué dans le paragraphe II.5 de la partie Matériels et Méthodes.

Dans un premier temps, nous avons vérifié que les différents traitements avaient bien fonctionné en analysant l'expression de certains gènes cibles connus des PPARs. En effet, d'après la littérature, PPAR γ active par exemple l'expression de *FATP* et *PPARG* lui-même, PPAR α active l'expression de *CPT1* et *PPARA* lui-même et PPAR β/δ active l'expression de *CD36* et *CPT1*. Nous avons donc vérifié par qPCR en temps réel que l'activation des PPARs par leurs agonistes respectifs entraînait l'augmentation de l'expression de ces différents gènes cibles.

Concernant les cellules MIN6, bien que les traitements aient été effectués à plusieurs reprises, les résultats des gènes témoins positifs étaient trop hétérogènes pour pouvoir être interprétables dans ces cellules.

Dans les cellules INS-1E, suite à un traitement avec les agonistes des PPARs, l'expression des gènes cibles des PPARs est augmentée comme attendus, validant ainsi les traitements (Figure 25). Dans un second temps, nous avons analysé par qPCR (Figure 25) et par Western blot (Figure 26), l'expression de PROX1 suite à l'activation des différents PPARs par leurs agonistes respectifs.

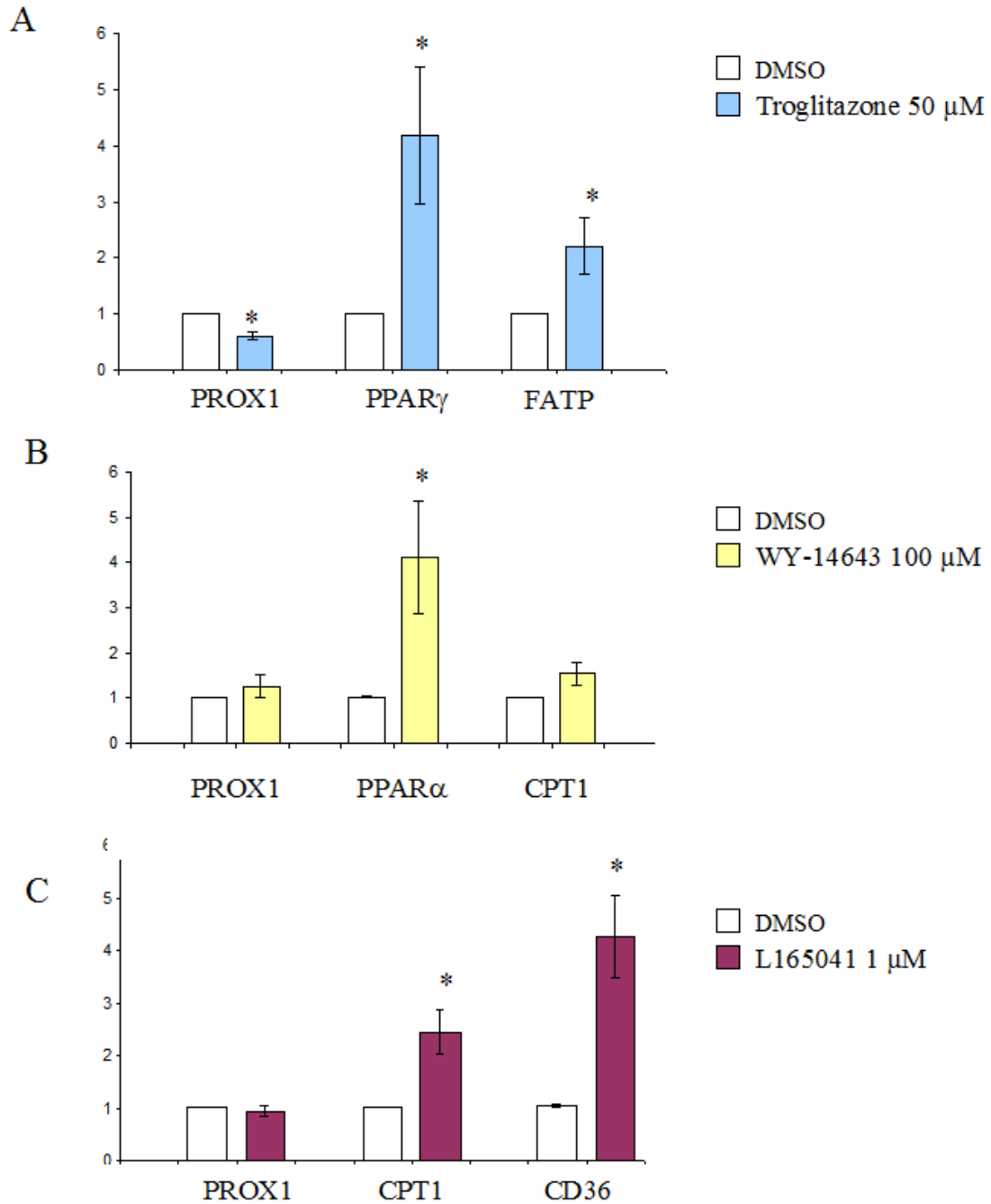


Figure 25 : Analyses par qPCR des effets des traitements avec les agonistes des PPARs sur l'expression de leurs gènes cibles et de PROX1.

Les cellules INS1-E ont été traitées avec les agonistes des PPARs ou du DMSO pendant 48h. A) Traitement avec la troglitazone (PPAR γ), B) traitement avec le W-14643 (PPAR α) et C) traitement avec le L165041 (PPAR β/δ). Leurs effets ont été mesurés par qPCR en temps réel. Le gène TFIIB a été utilisé comme gène de référence. Les résultats présentés sont représentatifs d'au moins 3 expériences. * $p < 0.05$ (test exact non-paramétrique Mann & Whitney).

DMSO = DiMéthylSulfOxyde

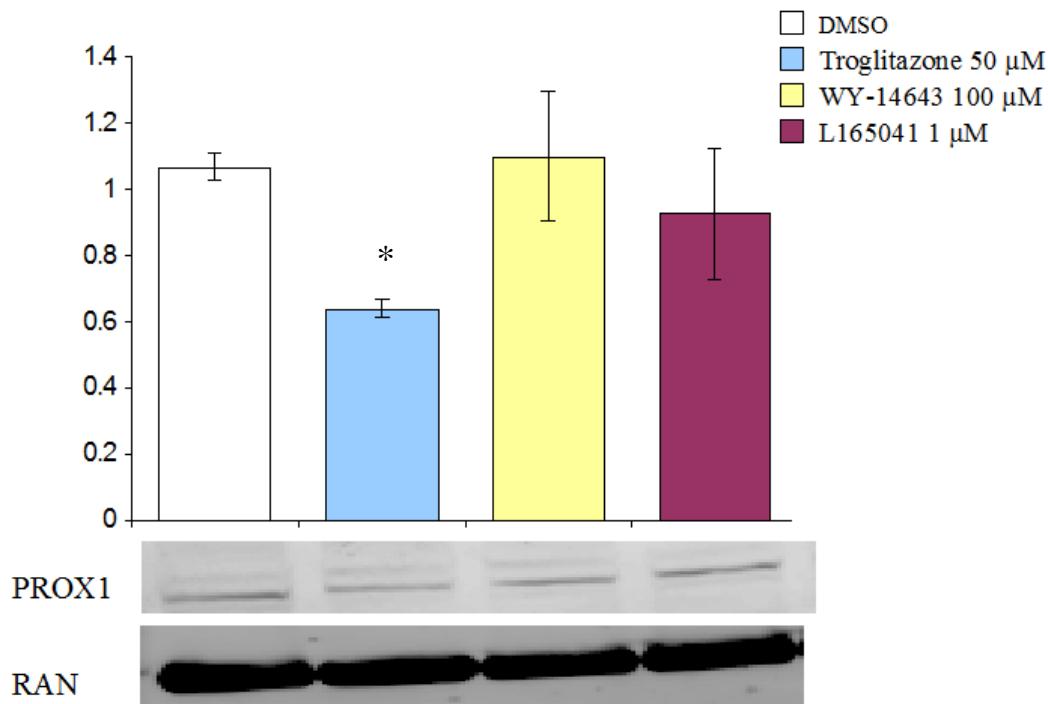


Figure 26 : Analyses par Western blot des effets des traitements avec les agonistes des PPARs sur l'expression de PROX1.

Les cellules INS1-E ont été traitées avec les agonistes des PPARs ou du DMSO pendant 48h. Leurs effets sur l'expression de PROX1 ont été mesurés par Western blot. L'expression de la protéine RAN (RAS-related Nuclear protein) a été utilisée comme référence. Les résultats présentés sont représentatifs d'au moins 3 expériences. * $p < 0.05$ (test exact non-paramétrique Mann & Whitney).
DMSO = DiMéthylSulfOxyde

D'après ces résultats, l'expression de PROX1 n'est pas modulée (que ce soit en ARNm ou en protéine), suite à un traitement avec le WY-146043 ou avec le L165041. Cependant, lorsque les cellules INS1-E sont traitées avec 50 μM de troglitazone (activant ainsi spécifiquement PPAR γ), l'expression de PROX1 est inhibée d'environ 45% au niveau de l'ARNm ($p = 1,5 \cdot 10^{-4}$) et d'environ 35% au niveau protéique ($p = 0,03$).

Contrairement à PPAR α et PPAR β/δ , PPAR γ semble donc inhiber l'expression de PROX1, probablement en se fixant au niveau des PPRE de ce dernier.

Suite à ces résultats, nous avons réalisé des traitements avec différentes concentrations en troglitazone afin de voir s'il existe un effet dose de l'activation de PPAR γ sur l'expression de PROX1 (Figure 27).

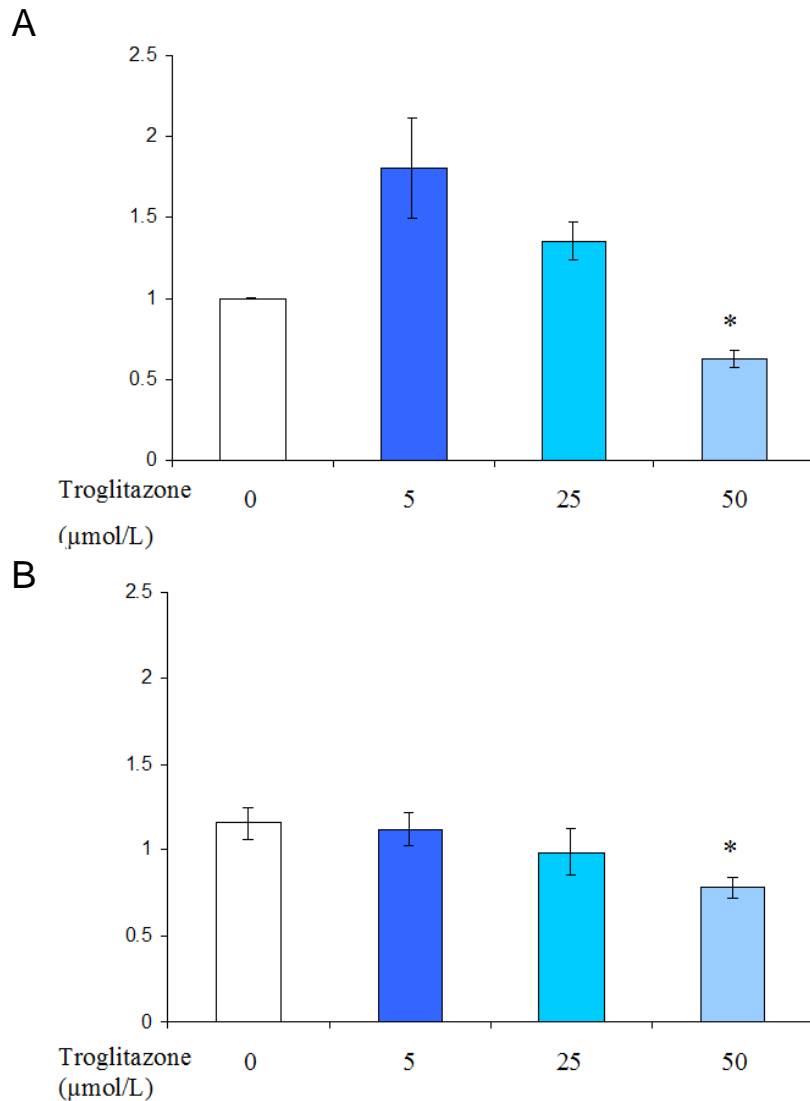


Figure 27 : Effet dose-dépendant d'un traitement à la troglitazone sur l'expression de PROX1.

Les cellules INS1-E ont été traitées avec 5, 25 ou 50 µM de troglitazone ou du DMSO, pendant 48h.

A) L'effet de la troglitazone a été mesuré par qPCR en temps réel. Le gène *TFIIB* a été utilisé comme gène de référence. Les résultats présentés sont représentatifs d'au moins 3 expériences. *p<0.05 (test exact non-paramétrique Mann & Whitney).

B) L'effet de la troglitazone a été mesuré par Western blot. L'expression de RAN a été utilisée comme référence. Les résultats présentés sont représentatifs d'au moins 3 expériences. *p<0.05 (test non-paramétrique Mann & Whitney).

D'après ces résultats, nous constatons que 5 µM de troglitazone conduit à une sur-expression de l'ARNm de *Prox1* d'environ 80%. Cependant, cette sur-expression n'est pas retrouvée au niveau protéique. L'augmentation progressive de la concentration en troglitazone (25 puis 50 µM) entraîne une diminution également

progressive de l'expression de PROX1, jusqu'à une inhibition d'environ 40% obtenue avec 50 μ M de troglitazone, à la fois au niveau de l'ARNm mais également au niveau protéique (Figures 25, 26 et 27). Il existe donc un effet dose-dépendant d'un traitement à la troglitazone sur l'expression de PROX1.

Nos résultats peuvent être mis en parallèle avec une étude réalisée par Kawai *et al.*, montrant qu'un traitement de 48h des cellules INS-1 avec 5 μ M de troglitazone augmente la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (5,6 ou 11 mM), probablement via PPAR γ et que plus la concentration en troglitazone augmente (à partir de 10 μ M), plus la sécrétion d'insuline diminue [Kawai *et al.* 2002]. Un traitement des cellules INS-1E avec 5 μ M de troglitazone entraîne donc une augmentation de l'expression de PROX1 et de la sécrétion d'insuline, et plus la concentration en troglitazone augmente, plus l'expression de PROX1 et la sécrétion d'insuline diminuent. Ces résultats corroborent nos résultats de siRNA montrant que PROX1 semble influencer la sécrétion d'insuline en réponse au glucose par les cellules β -pancréatiques.

En conclusion, l'expression de Prox1 semble être modulée par PPAR γ , probablement via sa fixation sur les PPREs présents au niveau du promoteur ou de l'intron 1 du gène *Prox1*. Des retards sur gel pourraient être menés pour vérifier cette hypothèse. Les concentrations en WY-146043 et en L165-041 que nous avons testées correspondant aux concentrations les plus élevées utilisées dans la littérature, il pourrait également être intéressant d'étudier l'impact de ces agonistes à des concentrations plus faibles. En effet, comme nous avons pu le constater avec la troglitazone, la modulation de l'expression de PROX1 varie selon sa concentration.

2. Détermination des gènes cibles de PROX1 dans les cellules β -pancréatiques.

Les résultats précédemment obtenus nous ont permis de montrer que PROX1 joue un rôle dans la réponse des cellules β -pancréatiques à une concentration élevée en glucose et plus particulièrement dans la sécrétion d'insuline. Afin de mieux comprendre le rôle de PROX1 dans le métabolisme glucidique, nous avons cherché à identifier ses gènes cibles dans les cellules β -pancréatiques. Aucun gène cible de PROX1 dans ces cellules n'est en effet connu à ce jour dans la littérature. Pour les

identifier, nous avons comparé les transcriptomes des cellules β -pancréatiques de rat (INS-1E) sous-exprimant PROX1 (siPROX1) avec ceux des cellules wild-type (siNT). Ces analyses ont été réalisées en collaboration avec le Docteur David Hot du Laboratoire d'Études Transcriptomiques et de Génomique Appliquée de l'Institut Pasteur de Lille. L'inhibition de l'expression de PROX1 a été préalablement validée par qPCR (diminution d'environ 40% ($p < 0,05$)) et les RIN des ARNs ont été vérifiés ; seuls les échantillons ayant un RIN supérieur à 6 (valeur acceptable en analyses transcriptomiques) ont été gardés pour la suite de l'étude.

a. Résultats et validation des analyses transcriptomiques

En prenant comme critères de sélection, une valeur p corrigée de 0,05 et un seuil de modulation de 1,4 fois, nous avons identifié 60 gènes sur-exprimés et 37 gènes sous-exprimés suite à l'inhibition de l'expression de PROX1 (Tableau 5).

Tableau 5 : Gènes sur-exprimés et sous-exprimés suite à l'inhibition de l'expression de PROX1 lors de l'analyse transcriptomique.

gènes sur-exprimés			gènes sous-exprimés		
gène	fold	p-value	gène	fold	p-value
Ramp1	5.14	0.0002	Klf14	0.38	0.0246
Ubd	3.62	0.0014	Scrt1	0.51	0.0062
Fzd9	2.09	0.0016	Kcnn1	0.52	0.0400
Rasgrp3	1.95	0.0025	Mansc4	0.55	0.0419
Dzip1	1.91	0.0242	Glul	0.56	0.0189
Atxn7l3	1.88	0.0276	Fam65b	0.57	0.0015
Car8	1.88	0.0048	Ntrk2	0.60	0.0317
Lxn	1.84	0.0027	Gcg	0.62	0.0336
Myc	1.78	0.0203	Unc93b1	0.62	0.0084
Igsf1	1.77	0.0033	Pias4	0.63	0.0073
Efna1	1.76	0.0063	Camk4	0.64	0.0399
Rab19	1.73	0.0093	Lrrc37a	0.64	0.0367
Pik3ip1	1.72	0.0027	Abhd8	0.64	0.0222
Bst2	1.71	0.0038	lpmk	0.64	0.0189
Tmtc3	1.69	0.0037	Galnt2	0.65	0.0186
Tnni3	1.69	0.0445	Slc2a5	0.65	0.0074
KIFC2	1.69	0.0037	Reep5	0.65	0.0226
Synj2	1.65	0.0251	Ripk1	0.66	0.0089
Enpp3	1.65	0.0151	Gpr153	0.66	0.0302
Aspg	1.62	0.0226	Shisa8	0.66	0.0055
Pla2g16	1.60	0.0127	Pex19	0.67	0.0313
Glce	1.60	0.0040	Mthfd2	0.67	0.0489
Id1	1.60	0.0083	Slc25a1	0.68	0.0453
Perp	1.59	0.0027	Igf1r	0.68	0.0303
Ptgr1	1.59	0.0321	Lphn1	0.69	0.0356
Mro	1.59	0.0487	Prkra	0.69	0.0226
Myliip	1.59	0.0051	Pabpn1l	0.69	0.0114
Cpt1b	1.57	0.0048	Mid1ip1	0.69	0.0074
Ramp1	1.56	0.0136	Ece1	0.69	0.0359
Parp14	1.56	0.0033	Gas7	0.69	0.0239
Ppp2r3a	1.55	0.0074	Hpse	0.70	0.0400
Fam151a	1.55	0.0088	Ros1	0.70	0.0265
Gcgr	1.55	0.0041	Ralb	0.70	0.0239
Vamp1	1.54	0.0189	Hmox1	0.70	0.0266
S100a4	1.54	0.0145	Kcni3	0.70	0.0328
C1r	1.53	0.0290	Lamc1	0.71	0.0110
Ugt1a6	1.53	0.0242	Dffa	0.71	0.0221
Fam96a	1.53	0.0075			
Gabarapl2	1.53	0.0221			
Matn2	1.52	0.0342			
Cpne9	1.52	0.0049			
Znrf1	1.50	0.0064			
Clic5	1.49	0.0189			
Add2	1.49	0.0299			
Fam176a	1.49	0.0202			
Psma3	1.49	0.0247			
Rspo4	1.49	0.0302			
Galnt4	1.49	0.0257			
G0s2	1.48	0.0107			
Hmgcs1	1.47	0.0053			
Plekha1	1.47	0.0356			
Ero1lb	1.47	0.0081			
Pnck	1.47	0.0239			
Tnnt1	1.46	0.0376			
Adora2b	1.46	0.0329			
Pigh	1.46	0.0400			
Csf1	1.45	0.0266			
Hnrnpul2	1.44	0.0308			
Arhgef9	1.44	0.0226			
Fbn2	1.43	0.0309			

Comme expliqué dans le chapitre II.8.a de la partie Matériels et Méthodes, les résultats des analyses transcriptomiques doivent être validés par une autre méthode. Quinze gènes ont donc été sélectionnés selon leur taux de modulation et leur appartenance à des voies de signalisations potentiellement intéressantes et ont été analysés en qPCR dans les mêmes échantillons (Tableau 6).

Tableau 6 : Gènes vérifiés en qPCR en temps réel et comparaison de leur modulation de leur expression par rapport aux analyses transcriptomiques.

	fold en q-PCR	fold en analyse transcriptomique
UBD	4.05	3.51
RAMP1	2.92	5.13
MYC	2.31	1.78
S100a4	1.71	1.54
ENPP3	1.61	1.65
GCGR	1.49	1.55
SYNJ2	1.41	1.65
TNNI3	1.37	1.69
MTHFD2	0.83	0.81
KCNN1	0.83	0.52
GLUL	0.68	0.56
IPMK	0.51	0.64
GCG	0.39	0.62
SCRT1	0.37	0.51
KLF14	0.68	0.38

Tous les gènes testés ont été validés en qPCR, confirmant ainsi les résultats de l'analyse transcriptomique. D'autres gènes candidats, qui n'apparaissent pas comme modulés dans les analyses transcriptomiques, ont été testés en qPCR tels que le gène de l'insuline, *HNF4 α* , *PAX6* et *PDX1* mais, même en q-PCR, leur expression n'apparaît pas modulée suite à l'inhibition de l'expression de PROX1.

D'après la liste de gènes modulés, nous pouvons constater que les gènes les plus sur-exprimés suite à l'inhibition de PROX1 sont les gènes *RAMP1* (*Receptor Activity-Modifying Protein*) et *UBD* (*Ubiquitin Binding Domain*) et le gène le plus inhibé est *KLF14* (*Kruppel-Like Factor 14*).

RAMP1 : est une protéine se fixant sur les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) pour en modifier leur fonctionnalité, notamment les RCPG des peptides de la famille de la calcitonine. Ces RAMPs se fixent également aux récepteurs de l'hormone parathyroïdienne, du glucagon et du VIP/PACAP ; ces derniers étant connus pour

stimuler la sécrétion d'insuline (Voir introduction Chapitre IV.2. et introduction Chapitre IV.4.c.ii) [Cueille *et al.* 2004]. Or, d'après nos résultats présentés précédemment, PROX1 semble jouer un rôle dans la sécrétion d'insuline en réponse au glucose des cellules β -pancréatiques. L'augmentation de l'expression de RAMP1 pourrait donc permettre de compenser la perte de l'expression de PROX1 et ainsi maintenir une sécrétion d'insuline suffisante dans ces cellules.

UBD : est un fragment protéique permettant la reconnaissance de molécules d'ubiquitine. Une fois fixée sur sa molécule cible, l'ubiquitine va altérer l'activité et la localisation de cette dernière et l'entraîner vers une voie de dégradation. La sumoylation est un autre processus de marquage de protéines. L'ubiquitination et la sumoylation ont des structures moléculaires semblables et interviennent tous les deux dans des processus de modifications post-transcriptionnelles. Cependant, contrairement à l'ubiquitination, la sumoylation ne participe pas qu'à la dégradation des protéines, elle participe également à différents processus cellulaires tels que le transport nucléaire, la régulation transcriptionnelle, l'apoptose et la stabilité protéique [Su *et al.* 2002]. Une étude réalisée par Pan *et al.* montre que la protéine Prox1 présente une sumoylation et que cette dernière contrôle sa capacité à diminuer l'expression de VEGFR3 et les phénotypes lymphatiques dans les cellules endothéliales [Pan *et al.* 2009]. L'ubiquitination pourrait alors être un autre moyen de contrôler l'expression de PROX1.

KLF14 : d'après l'étude GWA réalisée par Voight *et al.*, *KLF14* est associé au DT2 ainsi qu'au HDL-cholesterol [Voight *et al.* 2010]. De plus, Small *et al.* ont montré que ce gène est un régulateur important de l'expression de gènes dans le tissu adipeux [Small *et al.* 2011]. Or, suite à l'inhibition de l'expression de PROX1, *KLF14* est également fortement inhibée (- 62%), suggérant que PROX1 pourrait être impliqué dans la régulation de l'expression de ce gène dans les cellules β -pancréatiques.

b. Etudes des voies canoniques dans IPA

Nous avons ensuite voulu savoir si PROX1 était impliqué dans une voie biologique particulière. Pour cela, nous avons analysé tous les gènes différentiellement exprimés à l'aide du logiciel d'analyses de voies biologiques IPA. Les résultats obtenus avec les voies canoniques sont présentés dans le tableau 7.

.

Tableau 7 : Voies canoniques significatives dans IPA.

Voies canoniques	p-value	Ratio	Gènes
Métabolisme de l'azote	8.85E-04	3/119	ASPG,CCDC92,CA8
Métabolisme de l'amidon et du sucre	5.28E-03	3/166	ENPP3,UGT1A6,HPSE
Voie de signalisation CDK5	1.08E-02	3/94	LAMC1,NTRK2,PPP2R3A
Dégradation des phospholipides	1.08E-02	3/104	PLA2G16,HMOX1,ASPG
Voie de signalisation de l'endotheline-1	1.17E-02	4/185	PLA2G16,MYC,HMOX1,ECE1
Voie de signalisation Wnt/ β -caténine	1.19E-02	4/172	UBD,MYC,PPP2R3A,FZD9
Biosynthèse des O-Glycanes	1.30E-02	2/47	GALNT2,GALNT4
Pluripotence des cellules souches embryonnaires murines	1.37E-02	3/99	MYC,ID1,FZD9
Voie de signalisation du calcium	1.42E-02	4/210	TNNT1,CAMK4,TNNI3,PNCK
Voie de signalisation du métabolisme xénobiotique	1.65E-02	5/295	HMOX1,GSTA2,CAMK4,UGT1A6,PPP2R3A
Voie de signalisation de la neuropathie des neurones dorsaux de la corne	1.75E-02	3/112	KCNN1,CAMK4,NTRK2
Voie de signalisation du cancer de la thyroïde	1.88E-02	2/42	MYC,NTRK2
Rôle des macrophages, fibroblastes et endothélium dans l'arthrite rhumatoïde	2.18E-02	5/334	MYC,CAMK4,RIPK1,CSF1 (includes EG:12977),FZD9
Interconversions du pentose et du glucuronate	2.24E-02	2/142	UGT1A6,HPSE
Dépression synaptique à long terme	3.00E-02	3/148	PLA2G16,PPP2R3A,IGF1R
Métabolisme des glycérophospholipides	3.18E-02	3/192	PLA2G16,HMOX1,ASPG
Voie de signalisation de la phospholipase C	3.36E-02	4/260	HMOX1,CAMK4,RALB,ARHGEF9
Fibrose hépatique / Activation des cellules étoilées hépatiques	3.76E-02	3/147	CSF1 (includes EG:12977),IGF1R,ECE1
Voie de signalisation de l'apoptose médiée par Myc	3.86E-02	2/61	MYC,IGF1R
Induction de l'apoptose par le HIV1	3.98E-02	2/66	RIPK1,DFFA
Métabolisme des sucres nucléotidiques	4.14E-02	1/65	GLCE
Voie de signalisation du glioblastome multiforme	4.46E-02	3/168	MYC,IGF1R,FZD9

Le ratio représente le nombre de gènes retrouvés différentiellement modulés sur le nombre total de gènes présents dans cette voie.

D'après ces résultats, la modulation de l'expression de PROX1 semble intervenir dans plusieurs voies métaboliques notamment des voies associées au DT2 tels que les métabolismes de l'amidon et du sucre, la biosynthèse des O-glycanes, les interconversions du pentose et du glucuronate ainsi que le métabolisme des glycérophospholipides. PROX1 semble donc jouer un rôle dans le métabolisme glucidique en général.

Par ailleurs, certaines voies modulées suite à l'inhibition de l'expression de PROX1 sont également impliquées dans la sécrétion d'insuline tels que le métabolisme de l'azote [Bashan *et al.* 2009], la voie de signalisation de CDK5 [Wei *et al.* 2005], la voie de dégradation des phospholipides [Farese 2001], la voie de signalisation du calcium ainsi que la voie de signalisation de la phospholipase C. Or nous avons montré précédemment que PROX1 semble jouer un rôle dans la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Les gènes impliqués dans la sécrétion d'insuline et modulés lors de l'inhibition de l'expression de PROX1 pourraient donc être des cibles potentielles directes ou indirectes de PROX1.

De plus, certaines voies modulées sont impliquées dans la sensibilité à l'insuline et aux complications vasculaires tels que le métabolisme de l'azote, la voie de dégradation des phospholipides, la voie de signalisation de l'endothéline-1 et la voie Wnt/ β -caténine (comprenant UBD). PROX1 pourrait donc également jouer un rôle dans la sensibilité à l'insuline.

c. Etudes des fonctions biologiques dans IPA

Le logiciel IPA nous permet également de classer les gènes modulés suivant des fonctions biologiques. Ces dernières sont regroupées en maladies, fonctions moléculaires et cellulaires ainsi qu'en développement et fonction des systèmes physiologiques. Les résultats concernant les fonctions biologiques significatives dans IPA sont présentés dans la figure 28.

Diseases and Disorders		
Name	p-value	# Molecules
Cancer	2,74E-05 - 1,57E-02	42
Hematological Disease	2,74E-05 - 1,57E-02	2
Immunological Disease	2,74E-05 - 1,57E-02	3
Endocrine System Disorders	1,08E-04 - 1,57E-02	5
Reproductive System Disease	1,55E-04 - 1,57E-02	21
Molecular and Cellular Functions		
Name	p-value	# Molecules
Cellular Movement	8,18E-05 - 1,57E-02	16
Cellular Development	1,08E-04 - 1,57E-02	21
Cellular Growth and Proliferation	1,08E-04 - 1,57E-02	14
Cell Death	2,63E-04 - 1,57E-02	33
Cellular Assembly and Organization	5,15E-04 - 1,57E-02	21
Physiological System Development and Function		
Name	p-value	# Molecules
Cardiovascular System Development and Function	6,52E-05 - 1,41E-02	17
Tumor Morphology	8,18E-05 - 1,57E-02	8
Reproductive System Development and Function	1,08E-04 - 1,54E-02	6
Endocrine System Development and Function	2,71E-04 - 1,57E-02	3
Connective Tissue Development and Function	3,98E-04 - 1,57E-02	16

Figure 28 : Fonctions biologiques significatives dans IPA, classées en maladies, fonctions moléculaires et cellulaires et développement et fonction des systèmes physiologiques.

En ce qui concerne les maladies, nous retrouvons le désordre du système endocrinien, comprenant notamment les gènes du glucagon (GCG) et du récepteur au glucagon (GCGR (Glucagon Receptor)). Le glucagon ainsi que le GLP-1 (une des protéines codées par le gène du glucagon) sont connus pour stimuler la sécrétion d'insuline comme présenté dans le chapitre IV.4.c.ii de l'introduction (Figure 12) [Magnan *et al.* 2005]. Au niveau des cellules bêta, le glucagon et le GLP-1 se fixent sur des RCPG. L'activation de ce récepteur entraîne l'activation de l'adénylate cyclase (AC) et la production d'AMPc (Figure 29). Cette dernière va activer la protéine kinase A ainsi que Epac1 et Epac2, 2 facteurs d'échange de nucléotide guanyle. Comme expliqué dans l'introduction, la PKA stimule la sécrétion d'insuline en fermant les canaux potassiques sensibles à l'ATP, en relarguant le Ca^{2+} présent dans le reticulum endoplasmique et en affectant les granules de sécrétion d'insuline [Light *et al.* 2002]. En se fixant sur la PKA, l'AC va alors l'activer et augmenter la sécrétion d'insuline.

Après une longue stimulation par le GLP-1, la PKA transloque vers le noyau où elle va alors réguler les facteurs de transcription PDX1 et CREB, des activateurs de la transcription du gène de l'insuline [Doyle *et al.* 2007]. L'AMPc va également activer

Epac1 et Epac2, qui catalysent l'échange de GTP en GDP sur les protéines G, notamment Rap1A (Figure 29). Cette dernière régule les granules de sécrétion d'insuline et active la voie Raf/MEK/ERK menant à la prolifération des cellules bêta.

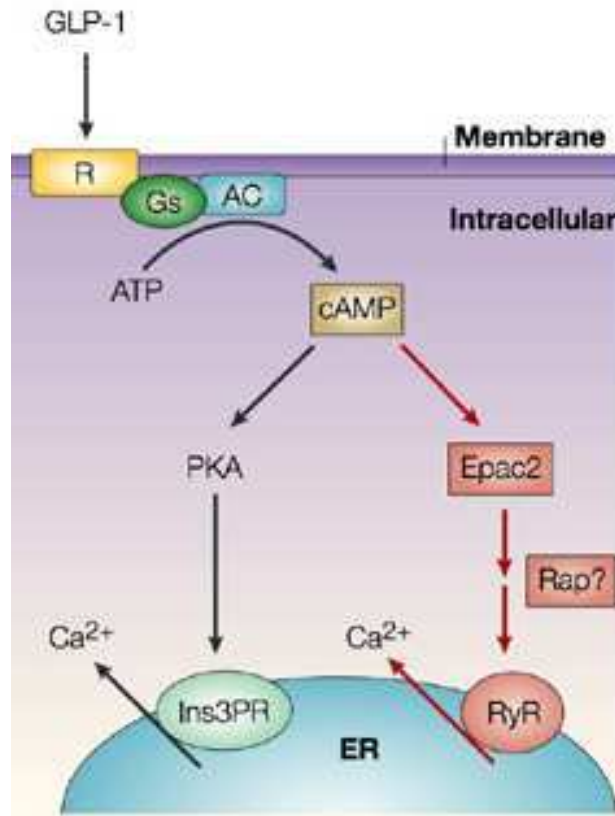


Figure 29 : Voie de signalisation du GLP-1 dans les cellules β -pancréatiques (d'après Bos *et al.*).

La régulation de la sécrétion d'insuline par le glucagon passe donc par une voie de signalisation du Ca^{2+} et de l'inositol, des voies canoniques retrouvées modulées dans nos analyses. Par ailleurs, d'après les résultats des analyses transcriptomiques, le gène du glucagon est inhibé suite à l'inhibition de l'expression de PROX1 (Tableau 5), suggérant que PROX1 active directement ou indirectement l'expression du gène du glucagon en conditions basales. Par ailleurs, Wang *et al.* ont réalisé des analyses transcriptomiques à partir de pancréas dépourvus de Prox1 et ont également retrouvé une diminution de l'expression du glucagon [Wang *et al.* 2005], ce qui confirme nos résultats.

Concernant les fonctions physiologiques, nous retrouvons le développement et les fonctions du système cardio-vasculaire et, plus particulièrement, des voies biologiques

impliquées dans la néo-vascularisation, la vasculogénèse ou bien encore la vasodilatation. Ces résultats sont cohérents avec les fonctions connues de Prox1 en tant que régulateur majeur du développement des vaisseaux lymphatiques [Wigle *et al.* 1999]. Nous retrouvons également dans cette partie, le développement et les fonctions du système endocrinien avec, là encore, la présence du gène du glucagon.

D'autres logiciels d'analyses de voies biologiques tels que Genomatix, Genego, Panther et TM4 EASE ont également été utilisés pour analyser les données des analyses transcriptomiques. Ces derniers ont fait ressortir les mêmes voies modulées suite à l'inhibition de PROX1, confirmant ainsi nos résultats. Nous avons cependant choisi d'utiliser les données d'IPA car ce logiciel est basé sur des références bibliographiques mises à jour régulièrement et les interactions moléculaires répertoriées sont vérifiées manuellement par leurs experts.

Nous aurions souhaité aller plus loin dans ces résultats en utilisant la technique de Chip-on-chip (Chromatin ImmunoPrecipitation on Chip) qui aurait permis d'évaluer la fixation directe de PROX1 sur ses gènes cibles mais aucune puce n'est actuellement disponible chez le rat.

En conclusion, les résultats des analyses transcriptomiques nous permettent de confirmer l'implication de PROX1 dans la sécrétion d'insuline des cellules bêta. Ils nous permettent également d'envisager des cibles potentielles directes ou indirectes de PROX1. Par la suite, il serait intéressant de valider l'implication de PROX1 dans les voies métaboliques afin de mieux comprendre son rôle dans le DT2 et plus particulièrement dans la sécrétion d'insuline.

Discussion générale/Perspectives

Le DT2 est une maladie métabolique complexe devenue un problème majeur de santé publique et dont les voies métaboliques mises en jeu ne sont pas totalement bien comprises. Par ailleurs, les patients sont souvent diabétiques depuis plusieurs années avant de le savoir. Il est donc nécessaire de caractériser les voies métaboliques mises en jeu dans cette maladie afin de pouvoir déterminer de nouvelles cibles thérapeutiques et de déterminer les populations à risque afin de limiter les complications. Le DT2 fait intervenir à la fois des facteurs environnementaux et des facteurs génétiques. Les avancées des nouvelles technologies, telles que les GWAS, ont permis la découverte de nouveaux gènes de susceptibilité au DT2. Cependant, les chercheurs estiment que seuls 10% d'entre eux ont été, à ce jour, découverts.

Différentes études GWA ont montré que *PROX1* est associé au DT2, au glucose à jeun ainsi qu'à une défaillance des cellules β -pancréatiques chez les adultes (index HOMA-B). Cependant, rien n'était connu concernant son impact chez les adolescents ainsi que son rôle dans l'apparition de la maladie.

Dans ce contexte, le but de ma thèse était de (i) tester l'impact de l'ensemble de la variabilité génétique commune du gène *PROX1* (80 SNPs) sur les traits biochimiques associés au DT2 chez les adolescents, (ii) analyser la fonctionnalité des SNPs associés dans des hépatocytes humains (HepG2) et dans des cellules β -pancréatiques de souris (MIN6), (iii) évaluer le rôle de *Prox1* sur la sécrétion d'insuline en réponse au glucose dans des cellules β -pancréatiques de rat (INS-1E), (iv) tester l'impact de facteurs de transcription sur la modulation de l'expression de *PROX1* et (v) déterminer des gènes cibles de *PROX1* dans les cellules β -pancréatiques de rat (INS-1E).

I. Discussion sur l'étude génétique

Dans un premier temps, nous avons réalisé des études génétiques afin d'analyser l'impact de l'ensemble de la variabilité génétique commune du gène *PROX1* (80 SNPs) sur les traits biochimiques associés au DT2 chez les adolescents (étude HELENA) et d'analyser la fonctionnalité des SNPs associés dans des hépatocytes humains (HepG2) et dans des cellules β -pancréatiques de souris (MIN6).

Nous avons montré que *PROX1* est associé à l'insulinémie à jeun et à la dysfonction des cellules β -pancréatiques chez les adolescents, confirmant ainsi les résultats des GWAS. Cependant, parmi les SNPs associés dans notre étude, nous n'avons pas retrouvé le SNP rs340874 mais 3 autres SNPs (rs340836, rs340837 et rs340838), associés à l'insulinémie à jeun chez les adolescents. De plus, nous avons montré dans des expériences *in vitro* de gène rapporteur Luciférase que des SNPs en fort DL avec eux (rs340835, rs340874 et rs340873) sont fonctionnels, dans les cellules HepG2 et MIN6. La présence des allèles à risque de ces SNPs serait associée à une plus faible expression de *PROX1*. Par la suite, en collaboration avec le Pr François Pattou (INSERM U859), nous allons tenter de valider la sous-expression de *PROX1* dans des échantillons de foie humain provenant de personnes diabétiques ou non diabétiques (cohorte ABOS).

Très récemment, une méta-analyse à grande échelle a été réalisée sur environ 150 000 individus et à l'aide d'une « Metabochip », une puce contenant 196 725 SNPs. Ces SNPs incluent, entre autres, des SNPs préalablement identifiés comme gènes de susceptibilité aux maladies métaboliques, athérosclérotiques et cardiovasculaires dans les GWAS [Morris *et al.* 2012]. Sur cette « Metabochip », 21 774 variants associés au DT2 sont représentés dont 5 057 SNPs capturant les plus forts signaux d'association indépendants provenant de la méta-analyse du consortium DIAGRAM. Par ailleurs, 16 717 variants, choisis à partir des données du projet 1000 Genomes, ont été inclus afin d'obtenir une cartographie plus fine des différents gènes de susceptibilité au DT2. Cette méta-analyse a été réalisée par le consortium DIAGRAMv3 sur 34 840 individus diabétiques et 114 981 témoins Européens chez lesquels environ 2,5 millions de SNPs ont été imputés et comprend 4 GWAS supplémentaires par rapport à la méta-analyse du consortium DIAGRAM2. Les auteurs ont ainsi pu mettre en évidence l'association de 10 nouveaux SNPs avec le DT2 [Morris *et al.* 2012]. Dans cette méta-analyse, les auteurs ont également analysé l'association de ces SNPs avec les traits glycémiques [Scott *et al.* 2012]. Ils ont ainsi pu identifier 41 nouveaux SNPs associés aux traits glycémiques dont 20 associés à la glycémie à jeun, 17 associés à l'insulinémie à jeun et 4 associés à la glycémie 2 h après un HGPO. En tout, près de 53 SNPs (les 12 précédemment découverts plus les 41 nouveaux loci) sont donc associés aux traits glycémiques dont 33 également

associés au DT2, confirmant une corrélation partielle entre les traits glycémiques et le DT2 [Scott *et al.* 2012].

Par ailleurs, les auteurs confirment l'association du SNP rs340874 (meilleur SNP dans les GWAS) du gène *PROX1* avec le DT2 (1,07 (1,04-1,09) $p = 1,1 \cdot 10^{-7}$) [Morris *et al.* 2012] et le glucose à jeun ($\beta=0,012$, $p=0,001$) [Scott *et al.* 2012]. Cependant, de meilleures associations ont été retrouvées avec d'autres SNPs de *PROX1*. En effet, d'après l'étude réalisée par Morris *et al.*, le SNP rs2075423 est le SNP le plus associé au DT2 (OR=1,07 (1,05-1,10) $p=8,1 \cdot 10^{-9}$) tandis que le SNP rs17712208 a le plus gros effet sur le DT2 (OR=1,20 (1,11-1,30) $p=3,9 \cdot 10^{-6}$) [Morris *et al.* 2012]. De plus, Scott *et al.*, ont décrit une plus forte association entre le SNP rs340878 et le glucose à jeun ($\beta = -0,0173$, $p=9,4 \cdot 10^{-7}$) [Scott *et al.* 2012]. D'après ces études, les SNPs rs2075423, rs17712208 et rs340878 ont donc un impact plus important sur le DT2 ou le glucose à jeun que le SNP rs340874 (ancien meilleur hit). Il est important de noter que les SNPs les plus associés aux concentrations d'insuline plasmatique dans l'étude HELENA (rs340836, rs340837 et rs340838) ainsi que les SNPs fonctionnels rs340874, rs340873 et rs340835 sont en DL modeste ($0,49 < r^2 < 0,68$) avec les SNPs retrouvés dans les études de Scott *et al.* et Morris *et al.*. De plus, les SNPs rs340836, rs340837, rs340838 et rs340873 ne sont pas présents sur cette « Metabochip ».

Nous avons également réalisé une imputation de la zone contenant les polymorphismes rs17712208, rs2075423 et rs340878 et analysé leurs impacts sur les concentrations plasmatiques d'insuline dans l'étude HELENA. La mesure de l'information du SNP rs1712208 n'était pas correcte (0,16); son impact sur l'insulinémie n'a donc pas pu être analysé. Dans l'étude HELENA, les SNPs rs2075423 et rs340878 sont associés aux concentrations plasmatiques d'insuline ($p=0,014$ et $p=0,011$, respectivement) mais moins fortement que les SNPs rs340836, rs340837, rs340838 ($p=0,0027$, $p=0,0021$ et $p=0,0029$, respectivement). Il semble donc que les SNPs retrouvés associés dans notre étude aient un impact plus important sur les concentrations plasmatiques d'insuline chez les adolescents, que les SNPs retrouvés dans les études de Morris *et al.* et Scott *et al.*.

Nos résultats apportent donc des informations complémentaires sur l'impact de la variabilité génétique du gène *PROX1* chez les adolescents.

Nous avons également étudié la fonctionnalité *in vitro* des SNPs rs2075423, rs17712208 et rs340878 dans les cellules MIN6 et nous avons constaté que l'allèle A

du SNP rs17712208 est associé à une activité Luciférase environ 3 fois plus faible ($p=0,10$) suggérant que l'expression du gène *PROX1* chez les individus porteurs de cet allèle est diminuée (Figure 30).

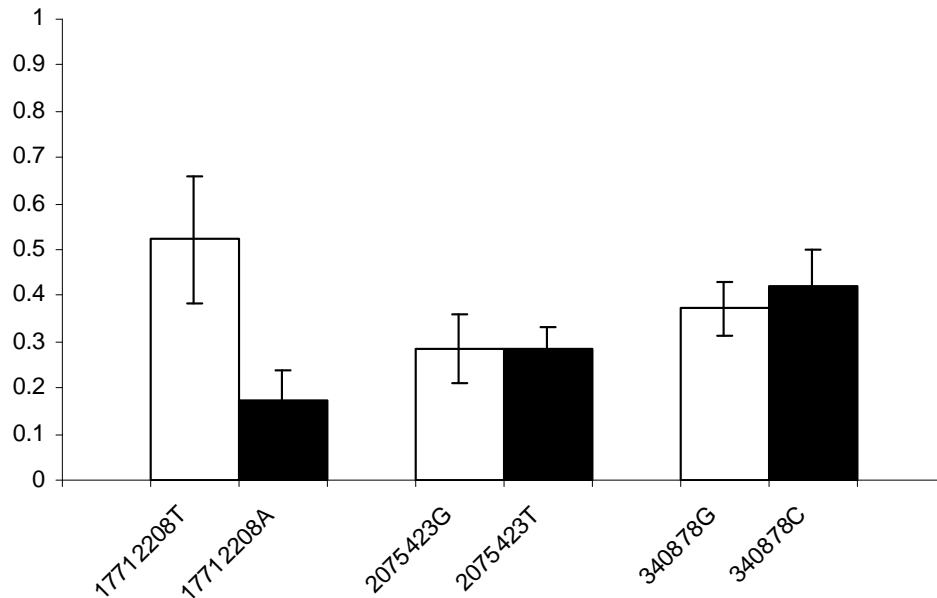


Figure 30 : Impact des 3 SNPs du gène *PROX1* sur l'activité Luciférase dans les cellules MIN6.

Les cellules MIN6 ont été transfectées transitoirement durant 48h avec soit le vecteur pGL4-minP vide soit les vecteurs pGL4-minP contenant les allèles des SNPs. L'activité de la Luciférase *Firefly* a été normalisée par rapport à l'activité de la Luciférase *Renilla*. L'activité des constructions est exprimée comme le rapport de l'activité comparé au vecteur pGL4-minP vide. Chaque barre représente la moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes.

Des expériences similaires sur les cellules HepG2 sont en cours. Des analyses *in silico* nous ont permis de voir que des sites putatifs de fixation pour le facteur de transcription HNF1 α (Hepatocyte Nuclear Factor 1 α), un facteur de transcription majeur dans le foie, sont soit présents soit absents en fonction des allèles du SNP rs17712208. Il serait intéressant dans la suite du projet de réaliser des retards sur gel afin de vérifier si HNF1 α se fixe au niveau des séquences contenant les allèles du SNP rs17712208 et s'il existe une différence d'affinité allélique.

II. Discussion sur les études moléculaires et cellulaires

Par la suite, nous avons cherché à comprendre le rôle de PROX1 dans la sécrétion d'insuline. Pour cela, nous avons réalisé des études moléculaires et cellulaires à partir de cellules β -pancréatiques de souris (MIN6) et de rat (INS-1E).

Afin d'analyser l'impact de PROX1 sur la sécrétion d'insuline, nous avons tout d'abord inhibé ce dernier par siRNA dans les cellules INS-1E, puis, nous avons dosé l'insuline sécrétée par ELISA. Nous avons alors constaté une diminution de la sécrétion d'insuline de 1,7 fois suite à une stimulation au glucose. De plus, nous avons constaté avec les résultats des analyses transcriptomiques que l'inhibition de l'expression de *PROX1* modulait l'expression de gènes impliqués dans certaines voies de sécrétion d'insuline. En tant que facteur de transcription, PROX1 pourrait donc moduler l'expression de gènes présents dans ces voies et exercer un rôle dans la fonction des cellules β -pancréatiques. Nos résultats sont en accord avec les résultats des GWAS montrant que PROX1 est associé à un indice HOMA-B plus faible [Dupuis *et al.* 2010], ce qui est le reflet d'une dysfonction de la cellule bêta. Il serait intéressant dans la suite du projet de chercher à valider ces voies de signalisation et d'étudier les interactions potentielles de PROX1 avec des facteurs régulateurs de la sécrétion d'insuline. Également, il aurait été intéressant de réaliser des analyses transcriptomiques sur des cellules dont l'expression de PROX1 aurait été inhibée et qui auraient été traitées avec 3 ou 30 mM de glucose.

Par ailleurs, nous avons pu constater qu'un traitement au glucose des cellules INS-1E modulait l'expression de PROX1. Ces résultats suggèrent que la glycémie pourrait influencer l'expression de PROX1 qui à son tour interviendrait sur la sécrétion d'insuline. En cas d'hyperglycémie, l'expression de PROX1 serait alors augmentée afin de stimuler la sécrétion d'insuline et de diminuer la glycémie.

De plus, nous avons vu que l'activation de PPAR γ par la troglitazone diminue l'expression de Prox1 d'environ 50%, au niveau de l'ARNm et au niveau protéique. Les AG ont été identifiés comme ligands naturels des PPARs. Or nous avons vu dans la partie IV.4.c.ii de l'introduction, que l'entrée des AG dans les cellules

β -pancréatiques active la sécrétion d'insuline. Miles *et al.* et Hotamisligil *et al.* ont mis en évidence que l'activation de PPAR γ par la troglitazone entraîne l'inhibition de l'expression de TNF α , une protéine connue pour augmenter la résistance à l'insuline [Miles *et al.* 1997] et diminuer la transduction du signal de l'insuline [Hotamisligil *et al.* 1994]. Par ailleurs, Kim *et al.*, ont montré que PPAR γ active également la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme glucidique tels que GLUT2 et le gène de la glucokinase [Kim *et al.* 2004]. La modulation de l'expression de PROX1 par les PPARs pourrait être un des éléments expliquant son rôle dans la modulation de la sécrétion d'insuline.

Afin d'identifier quels PPRE parmi les 11 présents médient cette régulation, il pourrait être envisagé dans la suite du projet de réaliser une mutagenèse des différents PPREs identifiés et de tester la réponse à la troglitazone sur les différents mutants obtenus dans les cellules MIN6.

Par ailleurs, durant ma thèse, je me suis intéressée à la modulation de l'expression de PROX1 par les PPARs suite à la présence de PPRE au niveau du promoteur et de l'intron 1 du gène *PROX1* mais des sites consensus pour d'autres facteurs de transcription y sont également présents tels que PAX6, KLF, HNF1 ou PAX4. Or, ces derniers sont connus pour être impliqués dans l'homéostasie glucidique. Il pourrait alors être intéressant d'étudier si ces facteurs de transcription modulent réellement l'expression de PROX1.

III. Perspectives

Au début de ma thèse, aucune cellule β -pancréatique humaine n'était disponible; c'est pourquoi j'ai travaillé sur des cellules de rongeurs. Mais en 2011, Ravassard *et al.* sont parvenus à produire une lignée de cellules β -pancréatiques humaines fonctionnelles, appelées EndoC- β H1, qui sécrètent de l'insuline lorsqu'elles sont stimulées par du glucose ou par d'autres sécrétagogues [Ravassard *et al.* 2011]. Nous avons alors contacté le responsable de cette étude, le Pr Scharfmann, afin d'obtenir des ampoules de cette lignée cellulaire. Un accord de transfert de matériel est en cours. Lorsque nous disposerons de cette lignée humaine de cellules β -pancréatiques, des expériences de validation de l'impact de PROX1 sur la sécrétion d'insuline seront envisagées. Par ailleurs, si la sur-expression de PROX1 est possible

dans cette lignée, nous pourrions alors réaliser des analyses transcriptomiques à partir d'ARNs de cellules sur-exprimant PROX1 et comparer ces résultats à ceux de cellules sous-exprimant PROX1. Par ailleurs des puces de Chip-on-chip étant disponibles chez l'homme, il serait également possible de visualiser la fixation directe de PROX1 dans cette lignée.

Il est connu que des facteurs environnementaux telle que la nutrition combinée à une prédisposition génétique jouent un rôle important dans le risque de développer une maladie métabolique tel que le DT2 [Patel *et al.* 2010]. L'épigénétique représente l'interface entre les gènes et l'environnement. Elle désigne les processus moléculaires, permettant de moduler l'expression des gènes, qui ne sont pas fondés sur des changements dans la séquence de l'ADN. Outre le patrimoine génétique hérité des parents, qui confère des susceptibilités à certaines pathologies, les modifications épigénétiques constituent la mémoire des événements vécus, bénéfiques ou délétères, tout au long du cycle de la vie. La présence d'un environnement défavorable telle qu'une hyperglycémie peut permettre de révéler ce type de susceptibilité, avec le développement de pathologies tels que le DT2 ou l'obésité. En effet, de récentes découvertes ont fait apparaître la possibilité que les changements épigénétiques suite à des stimuli environnementaux semblent jouer un rôle important dans le développement du DT2 [Gilbert *et al.* 2012]. Durant ma thèse, j'ai pu observer que la modulation de l'expression de PROX1 dépendait à la fois de la génétique (présence ou non de tel ou tel allèle) et de l'environnement (présence d'une hyperglycémie ou non). Contrairement aux marques génétiques, irréversibles, les marques épigénétiques sont potentiellement réversibles, offrant ainsi des cibles non seulement pour la prévention, mais aussi, peut-être, pour le traitement de certaines maladies complexes. Dans ce contexte, il pourrait être intéressant d'étudier les modifications épigénétiques de PROX1 et leurs rôles potentiels dans la survenue du DT2.

IV. Conclusion générale

En conclusion, durant ma thèse, j'ai montré que les SNPs rs340838, rs340837 et rs340836 SNPs du gène *PROX1* jouent un rôle important dans la régulation de la sécrétion d'insuline au niveau de la population. Ces SNPs tagguent probablement des SNPs fonctionnels cis-régulateurs tels que les SNPs rs340874, rs340873 et rs340835 qui sont associés à une expression du gène rapporteur plus faible *in vitro*. Par ailleurs, nos expériences moléculaires et cellulaires nous ont permis de confirmer l'impact de *PROX1* sur la sécrétion d'insuline en réponse au glucose dans les cellules β -pancréatiques. L'étude des analyses transcriptomiques par le logiciel IPA nous a permis de mettre en évidence des voies biologiques modulées par *PROX1*. Ces résultats devront être approfondis afin de mieux définir le rôle de *PROX1* dans la sécrétion d'insuline.

Bien que les mécanismes en jeu ne soient pas encore totalement bien compris, nos résultats représentent une première étape dans la compréhension de l'implication de *PROX1* dans le DT2. Comprendre le rôle de ce gène dans la fonction des cellules β -pancréatiques pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques ou de nouvelles voies métaboliques afin d'améliorer la survie et la fonction de ces cellules pour prévenir et traiter le DT2.

Bibliographie

Ethnicity and cardiovascular disease. The incidence of myocardial infarction in white, South Asian, and Afro-Caribbean patients with type 2 diabetes (U.K. Prospective Diabetes Study 32). *Diabetes Care*. 1998; **21**: 1271-1277.

A

Ahren B. Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia*. 2000; **43**: 393-410.

Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *World Health Transplantation* 1999; WHO/NCD/NCS/99.2.

Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI *et al.* Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009; **120**: 1640-1645.

Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet.Med.* 1998; **15**: 539-553.

Alitalo K, Carmeliet P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell*. 2002; **1**: 219-227.

Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC *et al.* The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat.Genet.* 2000; **26**: 76-80.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2012; **35 Suppl**: S64-S71.

Archambeaud F, Attali JR, Bertagna X, Bringer J, Boitard C *et al.* Mesure de l'insulinosécrétion (I) Méthodes d'évaluation de l'insulinosécrétion dans les études de population. *Le Journal Faxé de l'Endocrinologue* 2001.

Arimura A, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptors: neuroendocrine and endocrine interaction. *Front Neuroendocrinol.* 1995; **16**: 53-88.

Aschard H, Chen J, Cornelis MC, Chibnik LB, Karlson EW *et al.* Inclusion of gene-gene and gene-environment interactions unlikely to dramatically improve risk prediction for complex diseases. *Am.J.Hum.Genet.* 2012; **90**: 962-972.

Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA *et al.* Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology*. 1992; **130**: 167-178.

Avignon A, Barbe P, Basdevant A, Bresson JL, Colette C *et al.* Diabète de type II Physiopathologie. *Cah.Nutr.Diét.* 2001; **36, Suppl 2**: 1-163.

B

- Banerji S, Ni J, Wang SX, Clasper S, Su J *et al.* LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J.Cell Biol.* 1999; **144**: 789-801.
- Barker A, Langenberg C, Wareham NJ. Genetic determinants of glucose homeostasis. *Best.Pract.Res.Clin.Endocrinol.Metab.* 2012; **26**: 159-170.
- Barker A, Sharp SJ, Timpson NJ, Bouatia-Naji N, Warrington NM *et al.* Association of Genetic Loci With Glucose Levels in Childhood and Adolescence: A Meta-Analysis of Over 6,000 Children. *Diabetes.* 2011; **60**: 1805-1812.
- Barker DJ, Eriksson JG, Forsen T, Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int.J.Epidemiol.* 2002; **31**: 1235-1239.
- Bashan N, Kovsan J, Kachko I, Ovadia H, Rudich A. Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiol Rev.* 2009; **89**: 27-71.
- Baxter SA, Cheung DY, Bocangel P, Kim HK, Herbert K *et al.* Regulation of the lymphatic endothelial cell cycle by the PROX1 homeodomain protein. *Biochim.Biophys.Acta.* 2011; **1813**: 201-212.
- Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA.* 2002; **287**: 2570-2581.
- Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu.Rev.Med.* 2002; **53**: 409-435.
- Berne RM. Physiology (4th ed.). *Mosby* 1998.
- Bhasin S, Woodhouse L, Casaburi R, Singh AB, Bhasin D *et al.* Testosterone dose-response relationships in healthy young men. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab.* 2001; **281**: E1172-E1181.
- Bi X, Kajava AV, Jones T, Demidenko ZN, Mortin MA. The carboxy terminus of Prospero regulates its subcellular localization. *Mol.Cell Biol.* 2003; **23**: 1014-1024.
- Billings LK, Florez JC. The genetics of type 2 diabetes: what have we learned from GWAS? *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2010; **1212**: 59-77.
- Blaak E. Sex differences in the control of glucose homeostasis. *Curr.Opin.Clin.Nutr.Metab Care.* 2008; **11**: 500-504.
- Bland JM, Altman DG. Multiple significance tests: the Bonferroni method. *BMJ.* 1995; **310**: 170.
- Bouatia-Naji N, Bonnefond A, Cavalcanti-Proenca C, Sparso T, Holmkvist J *et al.* A variant near MTNR1B is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk. *Nat.Genet.* 2009; **41**: 89-94.
- Bouatia-Naji N, Rocheleau G, Van Lommel L, Lemaire K, Schuit F *et al.* A polymorphism within the G6PC2 gene is associated with fasting plasma glucose levels. *Science.* 2008; **320**: 1085-1088.
- Boyle PJ. Diabetes mellitus and macrovascular disease: mechanisms and mediators. *Am.J.Med.* 2007; **120**: S12-S17.
- Brissova M, Shiota M, Nicholson WE, Gannon M, Knobel SM *et al.* Reduction in pancreatic transcription factor PDX-1 impairs glucose-stimulated insulin secretion. *J.Biol.Chem.* 2002; **277**: 11225-11232.
- Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001; **414**: 813-820.

Buchanan TA, Xiang AH, Page KA. Gestational diabetes mellitus: risks and management during and after pregnancy. *Nat.Rev.Endocrinol.* 2012; **10**.

Burg MB. Molecular basis of osmotic regulation. *Am.J.Physiol.* 1995; **268**: F983-F996.

Burke Z, Oliver G. Prox1 is an early specific marker for the developing liver and pancreas in the mammalian foregut endoderm. *Mech.Dev.* 2002; **118**: 147-155.

Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J.Mol.Endocrinol.* 2000; **25**: 169-193.

C

Cauchi S, Meyre D, Durand E, Proenca C, Marre M *et al.* Post genome-wide association studies of novel genes associated with type 2 diabetes show gene-gene interaction and high predictive value. *PLoSOne.* 2008; **3**: e2031.

Chamnan P, Simmons RK, Forouhi NG, Luben RN, Khaw KT *et al.* Incidence of type 2 diabetes using proposed HbA1c diagnostic criteria in the european prospective investigation of cancer-norfolk cohort: implications for preventive strategies. *Diabetes Care.* 2011; **34**: 950-956.

Chan CB. Beta-cell stimulus - secretion coupling defects in rodent models of obesity. *Can.J.Physiol. Pharmacol.* 1995; **73**: 1414-1424.

Chan JC, Malik V, Jia W, Kadowaki T, Yajnik CS *et al.* Diabetes in Asia: epidemiology, risk factors, and pathophysiology. *JAMA.* 2009; **301**: 2129-2140.

Chan SL, Perrett CW, Morgan NG. Differential expression of alpha 2-adrenoceptor subtypes in purified rat pancreatic islet A- and B-cells. *Cell Signal.* 1997; **9**: 71-78.

Charest-Marcotte A, Dufour CR, Wilson BJ, Tremblay AM, Eichner LJ *et al.* The homeobox protein Prox1 is a negative modulator of ERR{alpha}/PGC-1{alpha} bioenergetic functions. *Genes Dev.* 2010; **24**: 537-542.

Choi M, Scholl UI, Ji W, Liu T, Tikhonova IR *et al.* Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2009; **106**: 19096-19101.

Clark A, Wells CA, Buley ID, Cruickshank JK, Vanhegan RI *et al.* Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes. *Diabetes Res.* 1988; **9**: 151-159.

Clayton D, McKeigue PM. Epidemiological methods for studying genes and environmental factors in complex diseases. *Lancet.* 2001; **358**: 1356-1360.

Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ.* 2000; **320**: 1240-1243.

Cook T, Pichaud F, Sonnevile R, Papatsenko D, Desplan C. Distinction between color photoreceptor cell fates is controlled by Prospero in Drosophila. *Dev.Cell.* 2003; **4**: 853-864.

Cueille C, Garel JM. [RAMPs and G protein coupled receptors]. *Med.Sci.(Paris).* 2004; **20**: 773-778.

D

D'Adamo E, Caprio S. Type 2 diabetes in youth: epidemiology and pathophysiology. *Diabetes Care*. 2011; **34 Suppl 2**: 161-165.

Dabelea D, Bell RA, D'Agostino RB, Jr., Imperatore G, Johansen JM *et al*. Incidence of diabetes in youth in the United States. *JAMA*. 2007; **297**: 2716-2724.

Davis TM. Ethnic diversity in type 2 diabetes. *Diabet.Med.* 2008; **25 Suppl 2**: 52-56.

De Martino MU, Alesci S, Chrousos GP, Kino T. Interaction of the glucocorticoid receptor and the chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II (COUP-TFII): implications for the actions of glucocorticoids on glucose, lipoprotein, and xenobiotic metabolism. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2004; **1024**: 72-85.

DECODE Study Group. Age- and sex-specific prevalences of diabetes and impaired glucose regulation in 13 European cohorts. *Diabetes Care*. 2003; **26**: 61-69.

Docherty K, Clark AR. Nutrient regulation of insulin gene expression. *FASEB J.* 1994; **8**: 20-27.

Dotevall A, Rosengren A, Bartnik M, Malmberg K, Ohrvik J *et al*. Sex-related aspects on abnormal glucose regulation in patients with coronary artery disease. *Eur.Heart J.* 2007; **28**: 310-315.

Doyle ME, Egan JM. Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas. *Pharmacol.Ther.* 2007; **113**: 546-593.

Dudek RW. High-yield embryology (3rd ed.). *Lippincott Williams & Wilkins* 2007.

Dufour CR, Levasseur MP, Pham NH, Eichner LJ, Wilson BJ *et al*. Genomic convergence among ERRalpha, PROX1, and BMAL1 in the control of metabolic clock outputs. *PLoS.Genet.* 2011; **7**: e1002143.

Dupuis J, Langenberg C, Prokopenko I, Saxena R, Soranzo N *et al*. New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nat.Genet.* 2010; **42**: 105-116.

Dyer MA, Livesey FJ, Cepko CL, Oliver G. Prox1 function controls progenitor cell proliferation and horizontal cell genesis in the mammalian retina. *Nat.Genet.* 2003; **34**: 53-58.

E

Efrat S. Regulation of insulin secretion: insights from engineered beta-cell lines. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2004; **1014**: 88-96.

Eichler EE, Flint J, Gibson G, Kong A, Leal SM *et al*. Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease. *Nat.Rev.Genet.* 2010; **11**: 446-450.

Elayat AA, el Naggat MM, Tahir M. An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets. *J.Anat.* 1995; **186**: 629-637.

Elsir T, Smits A, Lindstrom MS, Nister M. Transcription factor PROX1: its role in development and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2012; **31**: 793-805.

F

Fagot-Campagna A, Fosse S, Roudier C, Romon I, Penfornis A *et al.* Caractéristiques, risque vasculaire et complications chez les personnes diabétiques en France métropolitaine : d'importantes évolutions entre Entred 2001 et Entred 2007. *BEH* 2009; **42-43**.

Fajans SS, Floyd JC, Jr. Fasting hypoglycemia in adults. *N.Engl.J.Med.* 1976; **294**: 766-772.

Farese RV. Insulin-sensitive phospholipid signaling systems and glucose transport. Update II. *Exp.Biol.Med.(Maywood)*. 2001; **226**: 283-295.

Farilla L, Hui H, Bertolotto C, Kang E, Bulotta A *et al.* Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats. *Endocrinology*. 2002; **143**: 4397-4408.

Fisher E, Boeing H, Fritsche A, Doering F, Joost HG *et al.* Whole-grain consumption and transcription factor-7-like 2 (TCF7L2) rs7903146: gene-diet interaction in modulating type 2 diabetes risk. *Br.J.Nutr.* 2009; **101**: 478-481.

Flint J, Mackay TF. Genetic architecture of quantitative traits in mice, flies, and humans. *Genome Res.* 2009; **19**: 723-733.

Florez JC. Newly identified loci highlight beta cell dysfunction as a key cause of type 2 diabetes: where are the insulin resistance genes? *Diabetologia*. 2008; **51**: 1100-1110.

Fong DS, Aiello LP, Ferris FL, III, Klein R. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 2004; **27**: 2540-2553.

Ford ES, Li C, Sattar N. Metabolic syndrome and incident diabetes: current state of the evidence. *Diabetes Care*. 2008; **31**: 1898-1904.

Forst T, De La Tour DD, Kunt T, Pflutzner A, Goitom K *et al.* Effects of proinsulin C-peptide on nitric oxide, microvascular blood flow and erythrocyte Na⁺,K⁺-ATPase activity in diabetes mellitus type I. *Clin.Sci.(Lond)*. 2000; **98**: 283-290.

Fowler MJ. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Clinical Diabetes*. 2011; **29**: 116-122.

Francois M, Caprini A, Hosking B, Orsenigo F, Wilhelm D *et al.* Sox18 induces development of the lymphatic vasculature in mice. *Nature*. 2008; **456**: 643-647.

Furihata S, Ito T, Kamatani N. Test of association between haplotypes and phenotypes in case-control studies: examination of validity of the application of an algorithm for samples from cohort or clinical trials to case-control samples using simulated and real data. *Genetics*. 2006; **174**: 1505-1516.

G

Gallagher MP, Goland RS, Greenbaum CJ. Making progress: preserving beta cells in type 1 diabetes. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2011; **1243**: 119-134.

Galsgaard ED, Gouilleux F, Groner B, Serup P, Nielsen JH *et al.* Identification of a growth hormone-responsive STAT5-binding element in the rat insulin 1 gene. *Mol.Endocrinol.* 1996; **10**: 652-660.

Gauderman, W. J. and Morrison, JM. QUANTO 1.1: A computer program for power and sample size calculations for genetic-epidemiology studies, <http://hydra.usc.edu/gxe>. 2006.

Genuth S, Alberti KG, Bennett P, Buse J, Defronzo R *et al.* Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2003; **26**: 3160-3167.

Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 1996; **6**: 995-1001.

Gilbert ER, Liu D. Epigenetics: The missing link to understanding beta-cell dysfunction in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Epigenetics.* 2012; **7**: 841-852.

Girard J. Contribution of free fatty acids to impairment of insulin secretion and action. mechanism of beta-cell lipotoxicity. *Med.Sci.(Paris).* 2005; **21 Spec**: 19-25.

Gloyn AL, Weedon MN, Owen KR, Turner MJ, Knight BA *et al.* Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2003; **52**: 568-572.

Greenland S. Basic problems in interaction assessment. *Environ.Health Perspect.* 1993; **101 Suppl 4**: 59-66.

H

Harris MI, Hadden WC, Knowler WC, Bennett PH. Prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance and plasma glucose levels in U.S. population aged 20-74 yr. *Diabetes.* 1987; **36** : 523-534.

Harvey NL, Srinivasan RS, Dillard ME, Johnson NC, Witte MH *et al.* Lymphatic vascular defects promoted by Prox1 haploinsufficiency cause adult-onset obesity. *Nat.Genet.* 2005; **37**: 1072-1081.

Hassan B, Li L, Bremer KA, Chang W, Pinsonneault J *et al.* Prospero is a panneural transcription factor that modulates homeodomain protein activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1997; **94**: 10991-10996.

Haupt A, Thamer C, Machann J, Kirchhoff K, Stefan N *et al.* Impact of variation in the FTO gene on whole body fat distribution, ectopic fat, and weight loss. *Obesity.(Silver.Spring).* 2008; **16**: 1969-1972.

Hillier TA, Fagot-Campagna A, Eschwege E, Vol S, Cailleau M *et al.* Weight change and changes in the metabolic syndrome as the French population moves towards overweight: the D.E.S.I.R. cohort. *Int.J.Epidemiol.* 2006; **35**: 190-196.

Hills CE, Brunskill NJ. Cellular and physiological effects of C-peptide. *Clin.Sci.(Lond).* 2009; **116**: 565-574.

Hong YK, Harvey N, Noh YH, Schacht V, Hirakawa S *et al.* Prox1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. *Dev.Dyn.* 2002; **225**: 351-357.

Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, Li X, Orho-Melander M *et al.* Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat.Genet.* 2000; **26**: 163-175.

Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1994; **91**: 4854-4858.

Howie BN, Donnelly P, Marchini J. A flexible and accurate genotype imputation method for the next generation of genome-wide association studies. *PLoS.Genet.* 2009; **5**: e1000529.

I

Imamura M, Maeda S. Genetics of type 2 diabetes: the GWAS era and future perspectives. *Endocr.J.* 2011; **58**: 723-739.

International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature.* 2003; **426**: 789-796.

J

Jayapal KP, Sui S, Philp RJ, Kok YJ, Yap MG *et al.* Multitagging proteomic strategy to estimate protein turnover rates in dynamic systems. *J.Proteome.Res.* 2010; **9**: 2087-2097.

Johnson JD, Ahmed NT, Luciani DS, Han Z, Tran H *et al.* Increased islet apoptosis in Pdx1+/- mice. *J.Clin.Invest.* 2003; **111**: 1147-1160.

K

Kaijser M, Bonamy AK, Akre O, Cnattingius S, Granath F *et al.* Perinatal risk factors for diabetes in later life. *Diabetes.* 2009; **58**: 523-526.

Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH *et al.* Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1995; **92**: 3566-3570.

Kaltezioti V, Kouroupi G, Oikonomaki M, Mantouvalou E, Stergiopoulos A *et al.* Prox1 regulates the notch1-mediated inhibition of neurogenesis. *PLoS.Biol.* 2010; **8**: e1000565.

Kamiya A, Kakinuma S, Onodera M, Miyajima A, Nakauchi H. Prospero-related homeobox 1 and liver receptor homolog 1 coordinately regulate long-term proliferation of murine fetal hepatoblasts. *Hepatology.* 2008; **48**: 252-264.

Kampfer H, Kalina U, Muhl H, Pfeilschifter J, Frank S. Counterregulation of interleukin-18 mRNA and protein expression during cutaneous wound repair in mice. *J.Invest Dermatol.* 1999; **113**: 369-374.

Karalay O, Doberauer K, Vadodaria KC, Knobloch M, Berti L *et al.* Prospero-related homeobox 1 gene (Prox1) is regulated by canonical Wnt signaling and has a stage-specific role in adult hippocampal neurogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2011; **108**: 5807-5812.

Karsten SL, Kudo LC, Geschwind DH. Microarray platforms: introduction and application to neurobiology. *Int.Rev.Neurobiol.* 2004; **60**: 1-23.

Kawai T, Hirose H, Seto Y, Fujita H, Fujita H *et al.* Troglitazone ameliorates lipotoxicity in the beta cell line INS-1 expressing PPAR gamma. *Diabetes Res.Clin.Pract.* 2002; **56**: 83-92.

Kearney PM, Blackwell L, Collins R, Keech A, Simes J *et al.* Efficacy of cholesterol-lowering therapy in 18,686 people with diabetes in 14 randomised trials of statins: a meta-analysis. *Lancet.* 2008; **371**: 117-125.

Khan FA, Goforth PB, Zhang M, Satin LS. Insulin activates ATP-sensitive K(+) channels in pancreatic beta-cells through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Diabetes.* 2001; **50**: 2192-2198.

Kim HI, Ahn YH. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in the glucose-sensing apparatus of liver and beta-cells. *Diabetes.* 2004; **53 Suppl 1**: S60-S65.

Kitabchi AE, Umpierrez GE, Murphy MB, Kreisberg RA. Hyperglycemic crises in adult patients with diabetes: a consensus statement from the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2006; **29**: 2739-2748.

Kong A, Steinthorsdottir V, Masson G, Thorleifsson G, Sulem P *et al*. Parental origin of sequence variants associated with complex diseases. *Nature*. 2009; **462**: 868-874.

Koolman J, Röhm K-H. Color Atlas Of Biochemistry. *Thieme* 2005.

Koppenol WH. The Haber-Weiss cycle--70 years later. *Redox.Rep*. 2001; **6**: 229-234.

L

Laerm A, Helmbold P, Goldberg M, Dammann R, Holzhausen HJ *et al*. Prospero-related homeobox 1 (PROX1) is frequently inactivated by genomic deletions and epigenetic silencing in carcinomas of the biliary system. *J.Hepatol*. 2007; **46**: 89-97.

Lavado A, Lagutin OV, Chow LM, Baker SJ, Oliver G. Prox1 is required for granule cell maturation and intermediate progenitor maintenance during brain neurogenesis. *PLoS.Biol*. 2010; **8**: e1000460.

Lee S, Kang J, Yoo J, Ganesan SK, Cook SC *et al*. Prox1 physically and functionally interacts with COUP-TFII to specify lymphatic endothelial cell fate. *Blood*. 2009; **113**: 1856-1859.

Leibiger IB, Leibiger B, Berggren PO. Insulin feedback action on pancreatic beta-cell function. *FEBS Lett*. 2002; **532**: 1-6.

Lengler J, Krausz E, Tomarev S, Prescott A, Quinlan RA *et al*. Antagonistic action of Six3 and Prox1 at the gamma-crystallin promoter. *Nucleic Acids Res*. 2001; **29**: 515-526.

Lewis CE, Clark A, Ashcroft SJ, Cooper GJ, Morris JF. Calcitonin gene-related peptide and somatostatin inhibit insulin release from individual rat B cells. *Mol.Cell Endocrinol*. 1988; **57**: 41-49.

Light PE, Manning Fox JE, Riedel MJ, Wheeler MB. Glucagon-like peptide-1 inhibits pancreatic ATP-sensitive potassium channels via a protein kinase A- and ADP-dependent mechanism. *Mol.Endocrinol*. 2002; **16**: 2135-2144.

Liu YW, Gao W, Teh HL, Tan JH, Chan WK. Prox1 is a novel coregulator of Ff1b and is involved in the embryonic development of the zebra fish interrenal primordium. *Mol.Cell Biol*. 2003; **23**: 7243-7255.

Lonnstedt I, Britton T. Hierarchical Bayes models for cDNA microarray gene expression. *Biostatistics*. 2005; **6**: 279-291.

Luppi P, Cifarelli V, Tse H, Piganelli J, Trucco M. Human C-peptide antagonises high glucose-induced endothelial dysfunction through the nuclear factor-kappaB pathway. *Diabetologia*. 2008; **51**: 1534-1543.

M

Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res*. 2002; **30**: 1292-1305.

Magnan C, Ktorza A. Production et sécrétion de l'insuline par la cellule β -pancréatique. *EMC - Endocrinologie* 2005; **2**: 241-264.

Marx N, Walcher D, Raichle C, Aleksic M, Bach H *et al.* C-peptide colocalizes with macrophages in early arteriosclerotic lesions of diabetic subjects and induces monocyte chemotaxis in vitro. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2004; **24**: 540-545.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF *et al.* Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985; **28**: 412-419.

Matveyenko AV, Butler PC. Relationship between beta-cell mass and diabetes onset. *Diabetes Obes.Metab.* 2008; **10 Suppl 4**: 23-31.

Mauras N, Hayes V, Welch S, Rini A, Helgeson K *et al.* Testosterone deficiency in young men: marked alterations in whole body protein kinetics, strength, and adiposity. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 1998; **83**: 1886-1892.

McGarry JD. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes.* 2002; **51**: 7-18.

Meyer JA, Froelich JM, Reid GE, Karunarathne WK, Spence DM. Metal-activated C-peptide facilitates glucose clearance and the release of a nitric oxide stimulus via the GLUT1 transporter. *Diabetologia.* 2008; **51**: 175-182.

Miles PD, Romeo OM, Higo K, Cohen A, Razaat K *et al.* TNF-alpha-induced insulin resistance in vivo and its prevention by troglitazone. *Diabetes.* 1997; **46**: 1678-1683.

Mishima K, Watabe T, Saito A, Yoshimatsu Y, Imaizumi N *et al.* Prox1 induces lymphatic endothelial differentiation via integrin alpha9 and other signaling cascades. *Mol.Biol.Cell.* 2007; **18**: 1421-1429.

Mishra A, Newman EA. Inhibition of inducible nitric oxide synthase reverses the loss of functional hyperemia in diabetic retinopathy. *Glia.* 2010; **58**: 1996-2004.

Miyazaki J, Araki K, Yamato E, Ikegami H, Asano T *et al.* Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology.* 1990; **127**: 126-132.

Moreno LA, De Henauw S, Gonzalez-Gross M, Kersting M, Molnar D *et al.* Design and implementation of the Healthy Lifestyle in Europe by Nutrition in Adolescence Cross-Sectional Study. *Int.J.Obes.(Lond).* 2008; **32 Suppl 5**: S4-11.

Morris AP, Voight BF, Teslovich TM, Ferreira T, Segre AV *et al.* Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. *Nat.Genet.* 2012; **44**: 981-990.

N

Nagy E, Vicente-Rodriguez G, Manios Y, Beghin L, Iliescu C *et al.* Harmonization process and reliability assessment of anthropometric measurements in a multicenter study in adolescents. *Int.J.Obes.(Lond).* 2008; **32 Suppl 5**: S58-S65.

Newsholme P, Bender K, Kiely A, Brennan L. Amino acid metabolism, insulin secretion and diabetes. *Biochem.Soc.Trans.* 2007; **35**: 1180-1186.

Nishikawa T, Kukidome D, Sonoda K, Fujisawa K, Matsuhisa T *et al.* Impact of mitochondrial ROS production on diabetic vascular complications. *Diabetes Res.Clin.Pract.* 2007; **77 Suppl 1**: S41-S45.

Nolan CJ, Leahy JL, Delghingaro-Augusto V, Moibi J, Soni K *et al.* Beta cell compensation for insulin resistance in Zucker fatty rats: increased lipolysis and fatty acid signalling. *Diabetologia*. 2006; **49**: 2120-2130.

Nordquist L, Shimada K, Ishii T, Furuya DT, Kamikawa A *et al.* Proinsulin C-peptide prevents type-1 diabetes-induced decrease of renal Na⁺-K⁺-ATPase alpha1-subunit in rats. *Diabetes Metab Res.Rev.* 2010; **26**: 193-199.

O

Ohlson LO, Larsson B, Svardsudd K, Welin L, Eriksson H *et al.* The influence of body fat distribution on the incidence of diabetes mellitus. 13.5 years of follow-up of the participants in the study of men born in 1913. *Diabetes*. 1985; **34**: 1055-1058.

Oliver G, Sosa-Pineda B, Geisendorf S, Spana EP, Doe CQ *et al.* Prox 1, a prospero-related homeobox gene expressed during mouse development. *Mech.Dev.* 1993; **44**: 3-16.

P

Pan MR, Chang TM, Chang HC, Su JL, Wang HW *et al.* Sumoylation of Prox1 controls its ability to induce VEGFR3 expression and lymphatic phenotypes in endothelial cells. *J.Cell Sci.* 2009; **122**: 3358-3364.

Park S, Kim dS, Daily JW, Kim SH. Serum prolactin concentrations determine whether they improve or impair beta-cell function and insulin sensitivity in diabetic rats. *Diabetes Metab Res.Rev.* 2011; **27**: 564-574.

Patel CJ, Bhattacharya J, Butte AJ. An Environment-Wide Association Study (EWAS) on type 2 diabetes mellitus. *PLoS.One.* 2010; **5**: e10746.

Peterhoff M, Sieg A, Brede M, Chao CM, Hein L *et al.* Inhibition of insulin secretion via distinct signaling pathways in alpha2-adrenoceptor knockout mice. *Eur.J.Endocrinol.* 2003; **149**: 343-350.

Petrie JR, Pearson ER, Sutherland C. Implications of genome wide association studies for the understanding of type 2 diabetes pathophysiology. *Biochem.Pharmacol.* 2011; **81**: 471-477.

Petrova TV, Nykanen A, Norrmen C, Ivanov KI, Andersson LC *et al.* Transcription factor PROX1 induces colon cancer progression by promoting the transition from benign to highly dysplastic phenotype. *Cancer Cell.* 2008; **13**: 407-419.

Phillips LK, Prins JB. Update on incretin hormones. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2011; **1243**: E55-E74.

Pinhas-Hamiel O, Zeitler P. The global spread of type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. *J.Pediatr.* 2005; **146**: 693-700.

Pinhas-Hamiel O, Zeitler P. Acute and chronic complications of type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. *Lancet.* 2007; **369**: 1823-1831.

Pipeleers DG. Heterogeneity in pancreatic beta-cell population. *Diabetes*. 1992; **41**: 777-781.

Poitout V, Hagman D, Stein R, Artner I, Robertson RP *et al.* Regulation of the insulin gene by glucose and fatty acids. *J.Nutr.* 2006; **136**: 873-876.

Pomerleau J, McKeigue PM, Chaturvedi N. Relationships of fasting and postload glucose levels to sex and alcohol consumption. Are American Diabetes Association criteria biased against detection of diabetes in women? *Diabetes Care*. 1999; **22**: 430-433.

Prentki M, Joly E, El Assaad W, Roduit R. Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes*. 2002; **51 Suppl 3**: S405-S413.

Prokopenko I, Langenberg C, Florez JC, Saxena R, Soranzo N *et al*. Variants in MTNR1B influence fasting glucose levels. *Nat.Genet*. 2009; **41**: 77-81.

Q

Qiao Q, Nakagami T, Tuomilehto J, Borch-Johnsen K, Balkau B *et al*. Comparison of the fasting and the 2-h glucose criteria for diabetes in different Asian cohorts. *Diabetologia*. 2000; **43**: 1470-1475.

Qin J, Gao DM, Jiang QF, Zhou Q, Kong YY *et al*. Prospero-related homeobox (Prox1) is a corepressor of human liver receptor homolog-1 and suppresses the transcription of the cholesterol 7-alpha-hydroxylase gene. *Mol.Endocrinol*. 2004; **18**: 2424-2439.

Quesada I, Tuduri E, Ripoll C, Nadal A. Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *J.Endocrinol*. 2008; **199**: 5-19.

R

Rabasa-Lhoret R, Laville M. [How to measure insulin sensitivity in clinical practice?]. *Diabetes Metab*. 2001; **27**: 201-208.

Rathmann W, Kowall B, Giani G. Type 2 diabetes: unravelling the interaction between genetic predisposition and lifestyle. *Diabetologia*. 2011; **54**: 2217-2219.

Ravassard P, Hazhouz Y, Pechberty S, Bricout-Neveu E, Armanet M *et al*. A genetically engineered human pancreatic beta cell line exhibiting glucose-inducible insulin secretion. *J.Clin.Invest*. 2011; **121**: 3589-3597.

Rebai A. [Linkage analysis for complex diseases: a new life for an old method]. *Arch.Inst.Pasteur Tunis*. 2000; **77**: 25-35.

Retnakaran R, Cull CA, Thorne KI, Adler AI, Holman RR. Risk factors for renal dysfunction in type 2 diabetes: U.K. Prospective Diabetes Study 74. *Diabetes*. 2006; **55**: 1832-1839.

Reynisdottir I, Thorleifsson G, Benediktsson R, Sigurdsson G, Emilsson V *et al*. Localization of a susceptibility gene for type 2 diabetes to chromosome 5q34-q35.2. *Am.J.Hum.Genet*. 2003; **73**: 323-335.

Ricci P, Blottière P-O, Weill A, Simon D, Tuppin P *et al*. Diabète traité : quelles évolutions entre 2000 et 2009 en France ? *BEH* 2010; **43-44** : 425-431.

Rice TK, Schork NJ, Rao DC. Methods for handling multiple testing. *Adv.Genet*. 2008; **60**: 293-308.

Ridderstrale M, Groop L. Genetic dissection of type 2 diabetes. *Mol.Cell Endocrinol*. 2009; **297**: 10-17.

Risebro CA, Searles RG, Melville AA, Ehler E, Jina N *et al*. Prox1 maintains muscle structure and growth in the developing heart. *Development*. 2009; **136**: 495-505.

Rothman KJ, Greenland S, Walker AM. Concepts of interaction. *Am.J.Epidemiol.* 1980; **112**: 467-470.

S

Sasson S, Ashhab Y, Melloul D, Cerasi E. Autoregulation of glucose transport: effects of glucose on glucose transporter expression and cellular location in muscle. *Adv.Exp.Med.Biol.* 1993; **334**: 113-127.

Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Burt NP, de Bakker PI *et al.* Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science.* 2007; **316**: 1331-1336.

Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M *et al.* The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC.Mol.Biol.* 2006; **7**: 3.

Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y *et al.* A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science.* 2007; **316**: 1341-1345.

Scott RA, Lagou V, Welch RP, Wheeler E, Montasser ME *et al.* Large-scale association analyses identify new loci influencing glycemic traits and provide insight into the underlying biological pathways. *Nat.Genet.* 2012; **44**: 991-1005.

Sekine N, Wollheim CB, Fujita T. GH signalling in pancreatic beta-cells. *Endocr.J.* 1998; **45 Suppl**: S33-S40.

Seufert J. Leptin effects on pancreatic beta-cell gene expression and function. *Diabetes.* 2004; **53 Suppl 1**: S152-S158.

Shaw JE, de Court, Boyko EJ, Zimmet PZ. Impact of new diagnostic criteria for diabetes on different populations. *Diabetes Care.* 1999; **22**: 762-766.

Sies H. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin.Wochenschr.* 1991; **69**: 965-968.

Singh R, Artaza JN, Taylor WE, Braga M, Yuan X *et al.* Testosterone inhibits adipogenic differentiation in 3T3-L1 cells: nuclear translocation of androgen receptor complex with beta-catenin and T-cell factor 4 may bypass canonical Wnt signaling to down-regulate adipogenic transcription factors. *Endocrinology.* 2006; **147**: 141-154.

Skelin M, Rupnik M, Cencic A. Pancreatic beta cell lines and their applications in diabetes mellitus research. *ALTEX.* 2010; **27**: 105-113.

Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L *et al.* A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature.* 2007; **445** : 881-885.

Slaughter MH, Lohman TG, Boileau RA, Horswill CA, Stillman RJ *et al.* Skinfold equations for estimation of body fatness in children and youth. *Hum.Biol.* 1988; **60**: 709-723.

Small KS, Hedman AK, Grundberg E, Nica AC, Thorleifsson G *et al.* Identification of an imprinted master trans regulator at the KLF14 locus related to multiple metabolic phenotypes. *Nat.Genet.* 2011; **43**: 561-564.

Smyth GK, Speed T. Normalization of cDNA microarray data. *Methods.* 2003; **31**: 265-273.

Song KH, Li T, Chiang JY. A Prospero-related homeodomain protein is a novel co-regulator of hepatocyte nuclear factor 4alpha that regulates the cholesterol 7alpha-hydroxylase gene. *J.Biol.Chem.* 2006; **281**: 10081-10088.

Sosa-Pineda B, Wigle JT, Oliver G. Hepatocyte migration during liver development requires Prox1. *Nat.Genet.* 2000; **25**: 254-255.

Stefan Y, Orci L, Malaisse-Lagae F, Perrelet A, Patel Y *et al.* Quantitation of endocrine cell content in the pancreas of nondiabetic and diabetic humans. *Diabetes*. 1982; **31**: 694-700.

Steffensen KR, Holter E, Bavner A, Nilsson M, Peltto-Huikko M *et al.* Functional conservation of interactions between a homeodomain cofactor and a mammalian FTZ-F1 homologue. *EMBO Rep*. 2004 ; **5** : 613-619.

Stein DT, Esser V, Stevenson BE, Lane KE, Whiteside JH *et al.* Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat. *J.Clin.Invest*. 1996; **97**: 2728-2735.

Stein DT, Stevenson BE, Chester MW, Basit M, Daniels MB *et al.* The insulinotropic potency of fatty acids is influenced profoundly by their chain length and degree of saturation. *J.Clin.Invest*. 1997; **100**: 398-403.

Stoffers DA, Zinkin NT, Stanojevic V, Clarke WL, Habener JF. Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nat.Genet*. 1997; **15**: 106-110.

Storey JD, Tibshirani R. Statistical significance for genomewide studies. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2003; **100**: 9440-9445.

Strowski MZ, Parmar RM, Blake AD, Schaeffer JM. Somatostatin inhibits insulin and glucagon secretion via two receptors subtypes: an in vitro study of pancreatic islets from somatostatin receptor 2 knockout mice. *Endocrinology*. 2000; **141**: 111-117.

Su HL, Li SS. Molecular features of human ubiquitin-like SUMO genes and their encoded proteins. *Gene*. 2002; **296**: 65-73.

T

Tabak AG, Jokela M, Akbaraly TN, Brunner EJ, Kivimaki M *et al.* Trajectories of glycaemia, insulin sensitivity, and insulin secretion before diagnosis of type 2 diabetes: an analysis from the Whitehall II study. *Lancet*. 2009; **373**: 2215-2221.

Takahashi M, Yoshimoto T, Shimoda M, Kono T, Koizumi M *et al.* Loss of function of the candidate tumor suppressor prox1 by RNA mutation in human cancer cells. *Neoplasia*. 2006; **8**: 1003-1010.

Teran-Garcia M, Bouchard C. Genetics of the metabolic syndrome. *Appl.Physiol Nutr.Metab*. 2007; **32**: 89-114.

Thorens B. Brain glucose sensing and neural regulation of insulin and glucagon secretion. *Diabetes Obes.Metab*. 2011; **13 Suppl 1**: 82-88.

Tregouet DA, Escolano S, Tiret L, Mallet A, Golmard JL. A new algorithm for haplotype-based association analysis: the Stochastic-EM algorithm. *Ann.Hum.Genet*. 2004; **68**: 165-177.

U

UK Prospective Diabetes Study. UK Prospective Diabetes Study. XII: Differences between Asian, Afro-Caribbean and white Caucasian type 2 diabetic patients at diagnosis of diabetes. UK Prospective Diabetes Study Group. *Diabet.Med*. 1994; **11**: 670-677.

V

Vague P, Nguyen L. Rationale and methods for the estimation of insulin secretion in a given patient: from research to clinical practice. *Diabetes*. 2002; **51 Suppl 1**: S240-S244.

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ *et al*. The sequence of the human genome. *Science*. 2001; **291**: 1304-1351.

Versmold B, Felsberg J, Mikeska T, Ehrentraut D, Kohler J *et al*. Epigenetic silencing of the candidate tumor suppressor gene PROX1 in sporadic breast cancer. *Int.J.Cancer*. 2007; **121**: 547-554.

Voight BF, Scott LJ, Steinthorsdottir V, Morris AP, Dina C *et al*. Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nat.Genet*. 2010; **42**: 579-589.

W

Wahren J, Ekberg K, Johansson J, Henriksson M, Pramanik A *et al*. Role of C-peptide in human physiology. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab*. 2000; **278**: E759-E768.

Wang J, Kilic G, Aydin M, Burke Z, Oliver G *et al*. Prox1 activity controls pancreas morphogenesis and participates in the production of "secondary transition" pancreatic endocrine cells. *Dev.Biol*. 2005a; **286**: 182-194.

Wang L, Zhu J, Shan S, Qin Y, Kong Y *et al*. Repression of interferon-gamma expression in T cells by Prospero-related homeobox protein. *Cell Res*. 2008; **18**: 911-920.

Wang WY, Barratt BJ, Clayton DG, Todd JA. Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nat.Rev.Genet*. 2005; **6**: 109-118.

Wardle J, Carnell S, Haworth CM, Plomin R. Evidence for a strong genetic influence on childhood adiposity despite the force of the obesogenic environment. *Am.J.Clin.Nutr*. 2008; **87**: 398-404.

Wei FY, Nagashima K, Ohshima T, Saheki Y, Lu YF *et al*. Cdk5-dependent regulation of glucose-stimulated insulin secretion. *Nat.Med*. 2005; **11**: 1104-1108.

Westermarck P, Andersson A, Westermarck GT. Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. *Physiol Rev*. 2011; **91**: 795-826.

Westmoreland JJ, Kilic G, Sartain C, Sirma S, Blain J *et al*. Pancreas-specific deletion of Prox1 affects development and disrupts homeostasis of the exocrine pancreas. *Gastroenterology*. 2012; **142**: 999-1009.

Wigle JT, Harvey N, Detmar M, Lagutina I, Grosveld G *et al*. An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *EMBO J*. 2002; **21**: 1505-1513.

Wigle JT, Oliver G. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell*. 1999; **98**: 769-778.

Y

Yamagishi S, Imaizumi T. Diabetic vascular complications: pathophysiology, biochemical basis and potential therapeutic strategy. *Curr.Pharm.Des*. 2005; **11**: 2279-2299.

Yamagishi S, Imaizumi T. Molecular mechanism of diabetic retinopathy: role of advanced glycation end products (AGEs) and their receptor (RAGE) in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi*. 2005; **109**: 338-345.

Yamagishi S, Nakamura K, Matsui T, Ueda S, Fukami K *et al.* Agents that block advanced glycation end product (AGE)-RAGE (receptor for AGEs)-oxidative stress system: a novel therapeutic strategy for diabetic vascular complications. *Expert.Opin.Investig.Drugs.* 2008; **17**: 983-996.

Z

Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS *et al.* Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science.* 2007; **316**: 1336-1341.

Zhao H, Yang T, Madakashira BP, Thiels CA, Bechtel CA *et al.* Fibroblast growth factor receptor signaling is essential for lens fiber cell differentiation. *Dev.Biol.* 2008; **318**: 276-288.